

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

Václava Lebedová

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium nasákavosti nanovláken připravených z
derivátů hyaluronanu**

**Study of water-absorption of nanofibres made
from hyaluronate derivatives**

Autor: Václava Lebedová
Obor: Farmacie
Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.
Školitel specialista: Ing. Jana Růžičková, Ph.D.

Hradec Králové

Duben 2013

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“.

V Hradci Králové dne

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své skvělé školitelce paní doc. PharmDr. Zdeňce Šklubalové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, ochotu a čas při zpracování diplomové práce, společnosti Contipro Group s.r.o. za poskytnuté zázemí a vstřícný přístup a paní Ing. Janě Růžičkové, Ph.D. za odborné vedení. Dále děkuji Bc. Barboře Vaňkové a Leoně Málkové za vstřícnost, ochotu a příjemné pracovní prostředí.

Obsah

1	Abstrakt.....	7
2	Abstract.....	8
3	Zadání	9
4	Seznam symbolů a zkratk	10
5	Úvod.....	11
6	Teoretická část	12
6.1	Hojení ran.....	12
6.1.1	Fáze hojení ran.....	12
6.1.2	Krytí ran.....	13
6.2	Nanovlákná	16
6.2.1	Výroba nanovláken	17
6.2.2	Využití nanovláken v medicíně	22
6.3	Kyselina hyaluronová.....	25
6.3.1	Výroba	26
6.3.2	Využití kyseliny hyaluronové	28
6.4	Deriváty hyaluronanu	30
6.4.1	Výroba	31
6.5	Sorpční vlastnosti nanovláknenných materiálů.....	33
7	Experimentální část.....	35
7.1	Použité suroviny.....	35
7.2	Použité přístroje	35
7.3	Použité metody.....	35
7.3.1	Příprava roztoků hyaluronanu.....	35
7.3.2	Měření povrchového napětí	36
7.3.3	Měření vodivosti	36
7.3.4	Měření viskozity	36
7.3.5	Příprava nanovláken zvlákňováním.....	37

7.3.6	Zesítnění nanovláken	37
7.3.7	Obrazová analýza.....	38
7.3.8	Měření nasákavosti	38
7.3.9	Zpracování výsledků	40
8	Výsledky	41
9	Diskuse.....	59
9.1	Parametry ovlivňující zvlákňování	59
9.1.1	Vliv povrchového napětí.....	59
9.1.2	Vliv vodivosti	59
9.1.3	Vliv koncentrace a viskozity.....	60
9.1.4	Ostatní parametry.....	60
9.2	Hodnocení nasákavosti.....	61
9.2.1	Vliv hmotnosti vzorku	61
9.2.2	Vliv doby působení UV záření	62
9.2.3	Vliv nasákačímho media.....	62
9.2.4	Srovnávací zkouška s Aquacelem.....	63
10	Závěry	64
11	Použitá literatura	65

1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Ing. Jana Růžicková, Ph.D.

Posluchač: Václava Lebedová

Název diplomové práce: Studium nasákavosti nanovláken připravených z derivátů hyaluronanu

Mikro a nanovlákná mají vhodné vlastnosti pro využití jako prostředky ke krytí a hojení ran. V této experimentální práci jsem studovala vlastnosti nanovláken vyrobených z nově syntetizovaných derivátů hyaluronanu (HA) pomocí vývojového modelu zařízení 4SPIN. K úpravě vlastností vodných roztoků HA byl použit polyethylenoxid 400 000. Výsledné roztoky měly vhodné povrchové napětí, vodivost a viskozitu potřebnou pro výrobu nanovláken.

Vzorky nanovláken byly zesítěny UV zářením po dobu 10 minut (HA10) nebo 60 minut (HA60). Vliv zesítení na sorpční schopnost nanovláken byl studován gravimetricky metodou volného bobtnání, při níž byl vzorek ponořen po dobu 5 minut v lázni obsahující vodu nebo 0,9% roztok chloridu sodného (poměr médium/vláknko 75:1). Nanovlákná zesítená po dobu 60 minut měla významně větší absorpci obou kapalných médií než nanovlákná zesítená po dobu 10 minut. Nasávací schopnost nanovláken HA60 byla srovnatelná se vzorkem komerčního krytí ran z celulosových vláken

2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of:	Pharmaceutical technology
Consultant:	Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D. Ing. Jana Růžičková, Ph.D.
Student:	Václava Lebedová
Title of Thesis:	Study of water-absorption of nanofibres made from hyaluronate derivatives

Micro and nanofibers have suitable properties to be used as dressing in healing of injuries. In this experimental work, I studied the properties of nanofibres made from new synthesized hyaluronate derivatives (HA). The nanofibres were manufactured by electrospinning method using model version of 4SPIN. To modify properties of the aqueous solutions of HA, polyethylene oxide 400 000 was used. The resulting solutions had an appropriate surface tension, conductivity, and viscosity required to prepare nanofibres.

The samples of nanofibres were crosslinked by UV radiation for 10 minutes (HA10) and/or 60 minutes (HA60). To study the influence of crosslinking on the sorption capacity of nanofibres, the free swell absorbency method was used in which samples were immersed in a bath containing water and/or a 0,9% aqueous solution of sodium chloride, respectively, for 5 minutes (liquor/fibre ratio of 75:1). The nanofibers crosslinked for 60 minutes had significantly larger absorbency of both liquid media than nanofibers crosslinked for 10 minutes. The absorbency ability of nanofibers HA60 was comparable with those of commercial dressing made of cellulosic fibres.

3 Zadání

Předmětem diplomové práce je v teoretické části podat přehled o hojení a krytí ran, o nanovlákněch, jejich výrobě a využití ve zdravotnictví, o kyselině hyaluronové a její výrobě a uplatnění ve farmacii a medicíně, o výrobě derivátů kyseliny hyaluronové a metodách studia jejich sorpčních vlastností.

Cílem experimentální práce je studium vlastností nanovláknenného materiálu připraveného z nově syntetizovaných derivátů kyseliny hyaluronové a jeho absorpčních schopností:

1. Měření roztokových parametrů derivátu kyseliny hyaluronové (viskozity, vodivosti a povrchového napětí) s ohledem na výrobnost nanovláken.
2. Studium vlivu doby zesítnění, hmotnosti vzorku a typu kapalného media na absorpční schopnost nanovláken (nasákavost).
3. Porovnání absorpčních schopností s vybraným komerčním přípravkem.

4 Seznam symbolů a zkratek

a	(m)	délka strany čtverce
D	(s ⁻¹)	rychlostní spád
Da		Dalton
G	(mS·cm ⁻¹)	elektrická vodivost
Hac		kyselina hyaluronová
m	(g/m ²)	plošná hmotnost
m ₀	(g)	hmotnost vzorku
m ₁	(g)	hmotnost absorbované kapaliny
m _{K0}	(g)	hmotnost kapaliny před absorbcí
m _{K1}	(g)	hmotnost kapaliny po absorpci
N	(g/g)	nasákavost
PAA		kyselina polyakrylová
PCL		polykaprolakton
PDLLA		polymer L a D formy kyseliny mléčné
PEO		polyethylenoxid
PGA		kyseliny polyglykolová
PLA		kyselina polymléčná
PLDA		kyselina polymléčná, D forma
PLGA		kopolymer PLA a PGA
PLLA		kyselina polymléčná, L forma
PUR		polyuretan
PVA		polyvinylalkohol
r	(m)	průměr
S	(m ²)	obsah
SD		směrodatná odchylka
UDP		uridindifosfát
η	(Pa·s)	viskozita
σ	(mN·m ⁻¹)	povrchové napětí
τ	(Pa)	smykové napětí

5 Úvod

K výrobě nanovláken je možno použít velké množství polymerů, které lze mezi sebou různě kombinovat a vytvářet tak materiály s vhodnými vlastnostmi. Uplatnění nanovláken nacházejí v mnoha odvětvích - v medicíně, strojírenství, kosmonautice, ekologii, energetice, oděvním průmyslu, kosmetice.

Nanovláken mohou být zpracována řadou technik. Nejvýznamnější metodou je metoda elektrostatické zvlákňování.

Mikro- a nanovlákené materiály vyrobené z přírodních i syntetických polymerů schopných intenzivně bobtnat se využívají také jako moderní zdravotnické prostředky pro terapii ran. Tyto materiály výborně absorbují tekutinu z rány a přispívají tak k efektivnějšímu a rychlejšímu hojení ran. Vynikající savost je způsobena poměrem plochy povrchu ke svému objemu a schopností zadržovat kapalinu v pórech mezi vlákny. Vhodnou metodou ke studiu absorpčních schopností (nasákavosti) těchto materiálů je gravimetrie.¹

Nanovláken připravená z hyaluronanu mají unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti, jsou biokompatibilní i biodegradabilní. Výhodou hyaluronanu je možnost obměny jeho molekuly nejrůznějšími chemickými reakcemi. Díky chemické modifikaci lze připravit deriváty požadovaných vlastností.

6 Teoretická část

6.1 Hojení ran

Rána je definována jako porušení integrity kožního krytu, který tvoří bariéru mezi zevním a vnitřním prostředím. Každé narušení kožního povrchu je spojeno se ztrátou kožní substance, která může zasáhnout různě hluboko do podkožních tkání.

Rány se dělí podle různých hledisek, dle rozsahu (zavřené, povrchové, hluboké, pronikající, komplikované), délky trvání (akutní a chronické), hloubky poškození, množství choroboplodných zárodků (aseptické, kontaminované, infikované), lokalizace, poškozených struktur (kůže a podkoží, šlachy, klouby).

Nejvýznamnější je dělení na rány akutní a chronické. Akutní rány vznikají náhle ve zdravé tkáni mechanickým (operační, řezné, bodné, sečné rány), termickým nebo chemickým poškozením. Chronické rány trvají déle než 4 týdny, často se jedná o recidivující rány s dlouhou dobou hojení. Tyto rány mohou mít příčinu venózní, arteriální, infekční, hypertenzní, neuropatickou, autoimunní, metabolickou (diabetické), tlakovou (dekubity), nádorovou a mnoho dalších příčin.^{2,3}

6.1.1 Fáze hojení ran

Hojení rány je opravný proces, který navazuje na poškození kůže a měkkých tkání. Jedná se o interakci komplexní kaskády buněčných reakcí, které vedou k obnovení povrchu, rekonstrukci a obnovení napětí poškozené tkáně. Hojení je systémový proces, popisovaný třemi fázemi - zánětlivou, proliferační a reepitelizační, které se nezávisle prolínají.⁴

Zánětlivá fáze

V první fázi hojení dochází k hemostáze, produkci tkáňového moku a vyčištění rány. Pokud se neobjeví komplikace, tato fáze trvá od poškození 2-5 dnů.

Proliferační fáze

Po několika málo dnech přechází rána v případě nekomplikovaného hojení do proliferační fáze, trvající od 2 dnů do 3 týdnů. V této fázi dochází ke granulaci a kontrakci. Působky uvolněné z krevních destiček, bílých krvinek a dalších imunitních buněk stimulují poraněnou tkáň k hojení. Fibroblasty začínají produkovat

velké množství kolagenu a proteoglykanů, tkáň vyplní defekt a dochází k neovaskularizaci. Při kontrakci se konce ran slepují a redukují tak defekt.

Reepitelizační fáze

Epitelizace je poslední fází hojení, začíná z okrajů nebo z epitelizačních ostrůvků uvnitř rány. Granulace vytvořila nosnou plochu pro tvorbu nového pojivového tkaniva a pokožky, která je tenká a bez kožních adnex (chlupů, vlasů, žláz a nehtů). Buňky migrují po vlhké spodině. Postupná přestavba a dozrávání jizvy probíhá ještě po dobu dalších 12 až 18 měsíců.^{4,5}

6.1.2 Krytí ran

Pro efektivní, rychlé a správné hojení rány je důležité zvolit vyhovující krytí rány. Správně zvolený krycí materiál by měl co nejlépe nahrazovat funkci neporušené kůže. Důležitými vlastnostmi krycího materiálu jsou savost a absorpční kapacita, prostupnost pro plyny, snášenlivost obvazů a bezpečná aplikace.⁶

Základní rozdělení krytí vychází z jejich funkce. Primární krytí se aplikuje přímo na povrch rány, nesmí ránu mechanicky ani jinak dráždit. Úlohou sekundárního krytí je fixace primárního krytí a absorpce nadbytečného exsudátu. Některé krytí může být i tzv. samofixační, takové krytí se na ráně udrží samo, nepotřebuje již jinak fixovat.

Dle způsobu ošetření se krytí ran dělí na suché a vlhké krytí.^{3,6}

Vlhké krytí

Bylo zjištěno, že rána, která se hojí ve vlhkém prostředí, má až o 40 % kratší dobu hojení ve srovnání s krytím suchým obvazem. Vlhkost rány je nezbytná pro dobrou granulaci a epitelizaci rány. Kromě toho vlhké krytí dokáže udržet konstantní teplotu rány a výměnu plynů, absorbuje či odvádí exsudát, netraumatizuje ránu při převazech a intervaly mezi převazy jsou celkově delší.

Výhody vlhkého krytí jsou zejména úspora času, menší počet převazů, snadnější manipulace, účinnější léčba, menší bolest, kratší doba hojení a hospitalizace, nižší výskyt komplikací, omezení rizika recidivy.

Existuje několik typů vlhkého hojení – aseptické krytí, krytí s aktivním uhlím, hydrokoloidní, hydrogelové, pěnové, alginátové, bioaktivní krytí, mokrá terapie a další.^{3,5,7}

Antiseptické krytí

Za antiseptické krytí je považován obvaz napuštěný antiseptickou složkou (jodpovidon, chlorhexidin, stříbro). Používá se k prevenci i léčbě infekce u mírně secernujících ran.

Krytí s aktivním uhlím

Aktivní uhlí obsažené v krytí absorbuje zápach. Jeho použití je vhodné u infikovaných ran, jako jsou dekubity, bércové vředy nebo otevřené rány. Toto krytí může obsahovat i jiné látky, např. stříbro, které působí antisepticky.

Hydrokoloidní krytí

Za hydrokoloidní krytí se považuje absorpční hydrokoloidní krytí s polopropustnou vrstvou z polyuretanu. Vnitřní vrstva hydrokoloidů je tvořena želatinou, pektiny, sodnou solí karmelosy). Při absorpci exsudátu z rány dochází k tvorbě gelu, který vytváří vlhké prostředí v ráně, tím je podporována granulace a epitelizace. Zároveň brání vstupu sekundární infekce do rány. Hydrokoloidní krytí jsou voděodolná a snadno se aplikují. Jsou vhodná na neinfikované rány, slabě až středně silně produkující exsudát.

Hydrogelové krytí

Hydrogely jsou obecně gelová krytí na bázi hydrofilních polymerů (karmelosy) s vysokým obsahem vody. Jsou dostupné ve formě polštářků nebo jako amorfni hmota, často v tubě. Absorbují nadbytečný exsudát, udržují optimální vlhkost (i v suché ráně), autolyticky odstraňují nekrózu a neporušují okolní zdravé buňky. Chrání ránu proti vstupu sekundární infekce. Tato krytí jsou indikována u dehydratovaných ran, k odloučení suchých nekróz, na rány povleklé nebo granulující s mírnou sekrecí.

Pěnové polyuretanové krytí

Krycí materiály na bázi polyuretanové pěny patří mezi terapeutická krytí s vysokou absorpční schopností. Jsou polopropustné, absorbují nadbytečný exsudát a mikroorganismy. Vše je pak při převazu odstraněno spolu s krytím. Svrchní film těchto polyuretanových krytí zároveň umožňuje evaporaci (odpaření) tekutých složek. Udržují v ráně vhodné vlhké mikroklima s prevencí macerace a stimulují její čištění. Zároveň fungují jako bariéra před vstupem infekce. Používají se u neinfikovaných, středně až silně exsudujících rán v čisticí i granulační fázi.

Alginátové krytí

Algináty (polymery tvořené vápenatými solemi kyseliny alginové) mají výborný čistící efekt a obrovskou absorpční schopnost. Vlákná se při kontaktu se sekretem rány změní v gel s vlastnostmi vlhkého krytí. Nasávají exsudát, zbytky odumřelých buněk a bakterií a uzavírají je do vznikajícího gelu. Udržují tak ránu optimálně vlhkou, čímž podporují vlastní procesy. Alginátová krytí jsou indikována na slabě až středně silně exsudující rány různého tvaru a hloubky ve fázi zánětlivé a fázi granulace.

Bioaktivní krytí

Pod pojmem bioaktivní krytí se skrývá krytí, které pomáhá snížit aktivitu proteáz (enzymy, které u chronické rány udržují zánět) a tak zároveň zvyšuje aktivitu vlastních buněčných růstových faktorů. Výrazně podporuje granulaci a epitelizaci rány, snižuje bolest v ráně, má antibakteriální účinky, zajišťuje příznivé vlhké mikroklima v ráně a podílí se na stabilizaci jejího vnitřního prostředí. Bioaktivní krytí jsou indikována jak u chronických ran, např. dekubity, bércové vředy, defekty diabetických nohou, rozpadlé chirurgické rány, tak u ran akutních – popáleniny, traumata aj. Nutná je dlouhodobá aplikace.⁸

Mokrý terapie

Jako mokrá terapie se označuje hydroaktivní krytí se superabsorpčním jádrem, které absorbuje exsudát včetně bakteriálních toxinů, buněčného detritu a patogenů a zároveň uvolňuje Ringerův roztok, který ránu proplachuje. Udržuje tak ránu čistou a optimálně vlhkou. Snižuje bakteriální zátěž a podporuje odstranění nekrotické části. Krytí je nepřilnavé ke spodině rány a převazy jsou snadné a nebolestivé. Typickým zástupcem je komerčně používaný výrobek polštářek TenderWet. Tento patentovaný mechanismus je vhodný pro čištění zejména infikovaných, povleklých, silně secernujících nebo nekrotických ran ve všech fázích hojení.^{3, 5, 7}

Suché krytí

Jako suché krytí označujeme gázové komprese, komprese z netkaných textilií a vícevrstvé polštářky. Úkolem suchého krytí je absorpce tekutiny, ochrana před sekundární infekcí a mechanickým dráždění. Krytí se upotřebí převážně v první fázi hojení ran. Používá se jako primární i sekundární krytí.

Gázový kompres

Tato krytí jsou bez vlastního terapeutického účinku. Využívají se hlavně jako sekundární krytí nebo k fixaci vhodného terapeutického krytí. Nevhodné je použití gázových kompresů jako primární krytí, protože lnou k ráně, převazy jsou pak bolestivé a traumatizují ránu i pacienta. Dále mají omezenou savost a neudržují optimální vlhkost rány, která pak často vysychá nebo naopak maceruje. Navíc jsou nutné častější kontroly rány a převazy.

Kompresy z netkaných textilií

Kompresy z netkaného textilu jsou vhodné k prvotnímu ošetření znečištěných a exudujících poranění, jako mechanická bariéra v kombinaci se sterilním krytím ran.

Vícevrstvé polštářky

Používají se k ošetření ran hlavně v první fázi hojení, kdy rána prokuje sekret. Fixují se pomocí obinadel nebo náplastí, mohou být i samofixační. Jsou součástí tzv. hotového obvazu. Polštářky se liší velikostí, absorpční kapacitou, použitým materiálem. Vícevrstvé polštářky se skládají z pěti vrstev: kontaktní a difuzní vrstva, rozváděcí jádro, absorpční jádro, vrstva zabraňující prosáknutí a vrchní vrstva.^{3,5}

Moderní zdravotnické prostředky pro terapii ran využívají mikro a nanovláknenné materiály vyrobené z přírodních i syntetických polymerů schopných intenzivně bobtnat. Tyto materiály výborně absorbují tekutinu z rány a přispívají tak k efektivnějšímu a rychlejšímu hojení ran. Proto se v další části zaměřují na nanovláknna, jejich výrobu a využití v medicíně.

6.2 Nanovláknna

Nanovláknna jsou definována jako vlákna s průměrem pohybujícím se kolem 100 nm. Díky své struktuře mají jedinečné vlastnosti a jsou využívány v mnoha oblastech. Mezi výjimečné vlastnosti nanovláken patří obrovský měrný povrch (až tisícinásobně větší než mikrovláknno), vysoká porozita, malá velikost pórů, průměr vláken, vynikající tuhost a houževnatost. Nanovláknna nabízejí nesmírné možnosti modifikace a funkcionalizace pomocí různých chemických a fyzikálních procesů během výroby anebo po ní. Vlastnosti nanovláken silně ovlivňuje materiál, ze kterého jsou

vyrobena. Lze je zhotovit z několika desítek přírodních i syntetických polymerů včetně biokompatibilních nebo biodegradabilních.^{9, 10, 11}

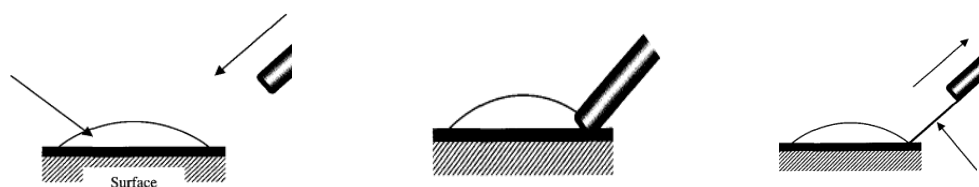
Mezi lety 1934 – 1944 byly poprvé realizovány pokusy o výrobu nanovláken. První výrobní technologie umožňující výrobu nanovláken se na globálním trhu objevily v 80. letech minulého století. Hlavní část z nich ale stále funguje především v laboratorních podmínkách. Nejčastěji pro výrobu využívají princip elektrostatického zvlákňování. Přelomovou modifikací elektrostatického zvlákňování byla v roce 2005 technologie Nanospider, kterou uvedla na trh česká firma Elmarco. Byla to první technologie na světě, která umožňovala průmyslovou výrobu nanovláken.^{9, 10, 12}

6.2.1 Výroba nanovláken

Nanovláknna mohou být zpracována řadou technik. Jednotlivé techniky se liší možnostmi použitých polymerů, využitím v laboratorních podmínkách nebo v průmyslu, průměrem vytvářených vláken apod. Nejvýznamnější metodou je metoda electrospinningu neboli elektrostatického zvlákňování. Dále se využívají techniky tažení (drawing), syntéza šablonou (template synthesis), fázová separace (phase separation), samosestavování (self-assembly) a v současnosti též metody electroblowing a force spinning.¹³

DRAWING – TAŽENÍ

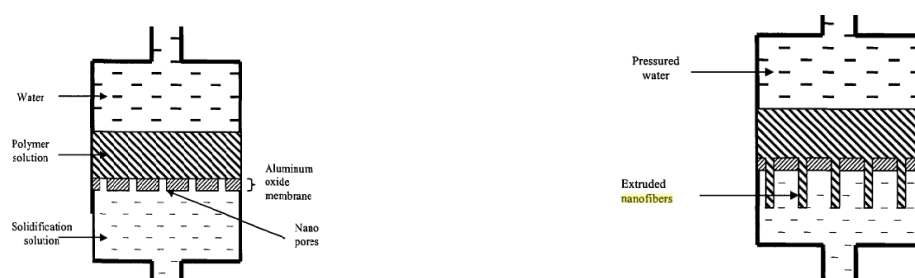
Technika drawing spočívá ve vytahování nanovláknna z okraje kapky pomocí mikropipety a mikromanipulátoru. Tato metoda se dá používat pouze v laboratorních podmínkách, nelze při ní řídit průměr vláken, celý proces je diskontinuální a rychlost vytahování vláken musí být asi $10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.¹⁴



Obr. 1: Schéma tvorby nanovláknna technikou tažení.¹⁴

TEMPLATE SYNTHESIS – SYNTÉZA ŠABLONOU

Tato metoda používá k získání nanovláken šablonu neboli membránu. Techniku produkce nanovláken syntézou šablonou lze použít pouze v laboratorních podmínkách. Membrány jsou vyrobené ze speciálních materiálů – např. oxid hlinitý. Výhodné je, že lze korigovat průměr nanovláken.¹⁴

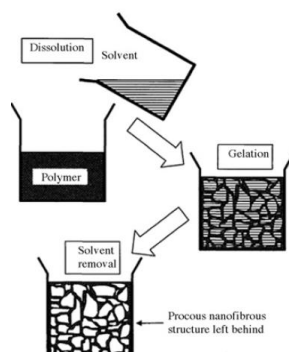


Obr. 2: Schéma tvorby nanovláken technikou syntéza šablonou.¹⁴

PHASE SEPARATION – FÁZOVÁ SEPARACE

Hlavním mechanismem této metody je oddělení fází v důsledku fyzikálních inkompatibilit. Celý postup tvorby nanovláken fázovou separací se skládá ze čtyř kroků – rozpuštění polymeru v roztoku, oddělení fází a gelace při nízké teplotě po určitou dobu, odstranění rozpouštědla a vysušení pomocí lyofilizace (freeze drying).

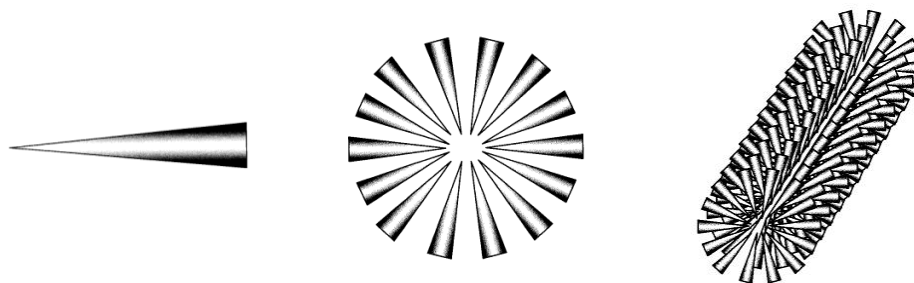
Fázovou separací vznikají vysoce porézní nanovlákná o průměru 50 – 500 nm. Tuto metodu lze využít pouze v laboratorním měřítku a pouze u některých polymerů – např. PLLA, PLGA, PDLA^{14, 15}



Obr. 3: Schéma tvorby nanovláken technikou fázové separace.¹⁵

SELF – ASSEMBLY – SAMOSESTAVOVÁNÍ

Samosestavování je proces, při kterém nanovlákná vznikají organizací a uspořádáním molekul do struktur prostřednictvím nekovalentních sil, tj. pomocí vodíkových můstků, hydrofobních nebo elektrostatických sil. Tímto procesem lze nanovlákná vyrábět pouze v laboratorních podmínkách. Nelze regulovat rozměry nanovláken - délku a průměr. Vznikají velmi jemná nanovlákná o průměru 7 – 100 nm.¹⁵

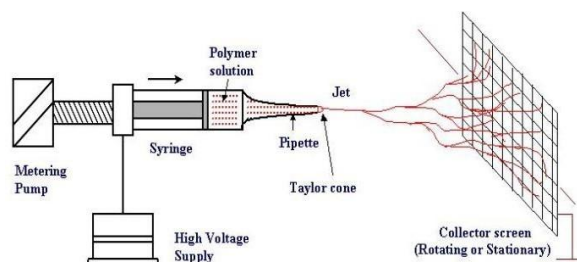


Obr. 4: Schéma tvorby nanovláken samosestavováním.¹⁴

ELECTROSPINNING – ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Elektrostatické zvlákňování je v podstatě jednoduchý způsob výroby nanovláken, který je úspěšně využíván v průmyslu. K tvorbě nanovláken je využíváno vysoké elektrické napětí. Nanovlákná mohou vznikat z roztoků polymerů nebo z tavenin polymerů. Zařízení pro realizaci electrospinningu obsahuje tři základní komponenty: zdroj vysokého napětí, zvlákňovací trysku (kapiláru) a kolektor. Roztok polymeru nebo tavenina se vstřikuje konstantní rychlostí do trysky. Kapalina je v přímém kontaktu s vysokým napětím, typicky 10 - 30 kV, ale i 80 kV. Použité napětí indukuje náboj na povrchu kapaliny kapky. Když je dostatečně vysoké, dochází k deformaci polokulovitého povrchu kapaliny, až vznikne tzv. Taylorův kužel. Pokud dojde k dalšímu zvýšení elektrického pole až ke kritické hodnotě, je vlivem elektrostatických sil překonáno povrchové napětí Taylorova kužele a z povrchu

kapaliny je vypuzen nabitý proud tekutiny, který je přitahován k uzemněnému kolektoru. Kolektor je umístěn v pevné vzdálenosti od zvlákňovací kapiláry. Pokud je celý proces electrospinningu správně nastaven, dochází během letu proudu tekutiny k vypařování rozpouštědla z roztoku polymeru nebo k tunutí taveniny a na kolektor dopadají již suchá vlákna polymeru.^{15, 16, 17, 18, 19}



Obr. 5: Princip electrospinningu.²⁰

Na konečnou morfologii nanovlákn vyrobeného electrospinningem má vliv celá řada parametrů. Dělí se na parametry procesní, systémové a okolní.

Mezi procesní parametry patří elektrická vodivost a dielektrické vlastnosti použitého polymerního roztoku nebo taveniny, intenzita aplikovaného elektrického pole a elektrický proud procesu, vzdálenost mezi sběrnou a zvlákňovací elektrodou, průměr zvlákňovací trysky a rychlost podávání zvlákňovaného roztoku nebo taveniny (pokud jsou použity ke zvlákňování trysky) a pohyb cílové plochy, pokud se pohybuje.

Okolní parametry jsou teplota vzduchu, relativní vzdušná vlhkost a rychlost proudění vzduchu v komoře.

Jako systémové parametry jsou označovány vlastnosti zvlákňovaného materiálu, kterými jsou molekulová hmotnost polymeru, distribuce molekulové hmotnosti polymeru a jeho architektura (rozvětvený, lineární atd.), koncentrace polymerního roztoku (zvlákňování polymerních roztoků) viskozita, hustota, povrchové napětí a viskoelasticita roztoku, dále také teplota zvlákňování (ta je důležitá zejména při zvlákňování polymerních tavenin), rychlost odpařování rozpouštědla u roztoků a rychlost tunutí polymerní taveniny a přídavek aditiv.^{12, 15}

Existuje celá řada polymerů, které se používají pro elektrostatické zvlákňování a jsou schopny tvořit nanovlákna. Používají se polymery syntetické, přírodní i jejich směsi.

Vliv procesních a systémových parametrů na tvorbu nanovláken je popsán v experimentální části.

Modifikované metody electrospinningu – NanospiderTM, 4SPIN a Electroblowing

NanospiderTM

Jednoduché elektrostatické zvlákňování se realizuje zvlákňováním z trnu (kovové tyčky). Modifikovanou metodou je zvlákňování z válečku neboli technologie NanospiderTM – světový patent týmu Technické univerzity v Liberci a firmy Elmarco v roce 2004. Jde o zvlákňování z volné hladiny roztoku polymeru v silném elektrostatickém poli bez použití trysek. Tato technologie se zakládá na objevu, že je možné zvlákňovat nejen za pomoci kapiláry z kapky polymeru procházejícího tryskou do elektrického pole, ale z celé tenké vrstvy roztoku polymeru. Umožňuje výrobu nanovláken z vodou rozpustných polymerů, z polymerů ředitelných rozpouštědly (jako jsou kyseliny nebo bipolární roztoky) či z tavenin polymerů. Jsou vhodné pro výrobu organických i anorganických vláken. Technologie NanospiderTM nabízí řadu možností výrobního procesu. Lze použít široké spektrum různých polymerů, materiály s různými vrstvami, které obsahují nanovlákná o různých parametrech a s celkově odlišnými vlastnostmi. Lze také využít různých podkladových (nosných) materiálů. Hlavními výhodami technologie je vysoká výrobní kapacita, jednoduchá údržba a energeticky efektivní výroba a vysoká kvalita vzniklé nanovláknenné vrstvy.²¹

4SPIN

4SPIN je nová modifikace elektrostatického zvlákňování. Používá se ke zvlákňování přírodních i syntetických polymerů. Je vysoce modulárním zařízením. Lze použít čtyři zásadně odlišné typy zvlákňovacích elektrod (tenká kapilární jehla, sada šesti tenkých kapilárních jehel, bezjehlová tryska, bezjehlová multitryska) a čtyři různé typy kolektorů (statický kontinuální, statický vzorovaný, rotující kontinuální a rotující vzorovaný.) Většina zvlákňovacích elektrod je navíc připojena ke vzduchovodu, který umožňuje přivádět vzduch různé teploty v rozmezí 20-100°C určitou rychlostí. Díky těmto parametrům je více možností, při jakých podmínkách budou nanovlákná vznikat. Různé typy kolektorů umožňují vznik nanovláknenné

vrstvy s náhodně uspořádanými vlákny nebo s vlákny, které jsou organizovány určitým směrem. Zvlákňovací elektrody se mohou libovolně kombinovat i v průběhu jednoho zvlákňovacího procesu. Velkou výhodou tohoto zařízení je jeho centrální řídicí systém, který je zárukou stabilních provozních podmínek.²²

Electroblowing

Další modifikovanou metodou electrospinningu je electroblowing. Electroblowing je technika spojující electrospinning s prouděním vzduchu. Tangenciální síly proudícího vzduchu působí na kapky směsi a přispívají k tvorbě Taylorova kužele a k vytvoření vlákna. Jsou tak tvořeny optimální klimatické podmínky, které příznivě ovlivňují zvlákňování. Ve srovnání s konvenční electrospinningem má electroblowing čtyři významné výhody: 1.) Spojení sil použitého elektrického pole a proudění vzduchu zvyšuje účinnost procesu zvlákňování. 2.) Zvýšený průtok vzduchu snižuje viskozitu roztoku. 3.) Průtok vzduchu urychluje odpařování rozpouštědel z roztoku. 4.) Rychlost a teplota proudu vzduchu ovlivňují morfologii nanovláken. Metoda electroblowingu může úspěšně řešit zvlákňování bez použití povrchově aktivních látek nebo jiných rozpouštědel, které jsou toxické a nevhodné nebo dokonce zakázané pro lékařské použití. Toto je jediný způsob, ve kterém může být kyselina hyaluronová zvlákňována ve své původní podobě.^{22, 23}

6.2.2 Využití nanovláken v medicíně

Nanovlákná mají obrovské využití v mnoha odvětvích. Díky svým jedinečným a výhodným vlastnostem nacházejí uplatnění v medicíně, strojírenství, kosmonautice, ekologii, energetice, oděvním průmyslu, kosmetice. V této práci bych se zaměřila především na biomedicínské využití nanovláken.

V biomedicínské oblasti se nanovlákná uplatňují jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství, při řízeném uvolňování léčiv, jako obvazy pro hojení ran, jako lékařské implantáty nebo jako antiadhezní membrány. V těchto aplikacích vykazují lepší biokompatibilitu a nižší imunitní reakci přírodní polymery ve srovnání s polymery syntetickými, a to především kolagen, želatina, elastin, chitosan, kasein, acetát celulózy, fibrinogen, kyselina hyaluronová. Naproti tomu syntetické polymery nabízejí např. lepší mechanickou odolnost, požadovanou rychlost degradace

v organismu. Typické syntetické polymery používané v biomedicínských aplikacích jsou hydrofobní biodegradabilní polyestery, např. PGA, PCL, PLA, PU, PLGA.²⁵

Scaffolds pro tkáňové inženýrství

Biodegradabilní scaffolds jsou nepostradatelným prvkem v tkáňovém inženýrství. Používají se jako dočasné šablony pro naočkování buňkami, jejich invazi, proliferaci a diferenciaci tkáně, mohou napodobovat strukturu a biologické funkce přirozené extracelulární matrix. Morfologická podobnost umělé tkáně s nativní tkání je důležitá pro správné plnění biologických funkcí. Vláknité scaffolds sestavené z nanovláken úspěšně kopírují fyzickou strukturu extracelulární matrix buněk. Nanomateriály vykazují lepší buněčnou kompatibilitu, mechanické, elektrické, optické, katalytické a magnetické vlastnosti ve srovnání s konvenčními materiály. Pro přípravu nanovlákných scaffoldů jsou často používány přírodní polymery z důvodu jejich lepší biokompatibility. Používá se kolagen, algináty, proteiny, kyselina hyaluronová, fibrinogen, chitosan, škrob a další. Jejich přímísením do syntetických polymerů lze zlepšit celkovou buněčnou kompatibilitu. V tkáňovém inženýrství se využívají polymerní nanovlákná z PLGA, kolagenu, PCL, PLA, PLLA, PEG-PLA, kolagen II. typu, želatina/PCL.^{24, 25, 26, 27}

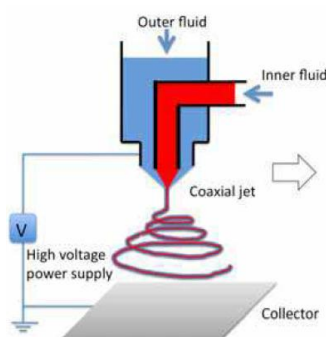
Řízené uvolňování léčiv

V distribuci léčiv bylo vždy klíčovým problémem, aby dodávání léčiv pacientům probíhalo způsobem, který je co nejvíce podobný způsobu fyziologickému. Podání léčiv v kombinaci s polymerními nanovláknými je založeno na teorii, že se zvětšujícím se povrchem se zvyšuje míra uvolňování léčiv. Léčiva se ze struktur nanovláken uvolňují v závislosti na použitém polymerním nosiči, způsobu zpracování nanovláken a interakci mezi polymerem a léčivem. Mohou se uvolňovat rychle, okamžitě nebo opožděně, trvale nebo pulzně.

Zpracování léčiv s polymery do nanovláken lze provádět následujícími způsoby:

- 1.) léčiva jsou jako malé částice připojeny na povrchu nanovlákného nosiče,
- 2.) léčiva i nosiče jsou elektrostaticky zvlákněny a následně propleteny dohromady,
- 3.) léčiva a nosiče jsou spojena do jednoho kompozitního nanovlákná.

Nejčastěji než výše uvedených způsobů zpracování nanovláken se využívá třetí techniky a to především metody koxiálního electrospinningu, při kterém se nanovláknem skládá z vnitřní části (léčivo) a vnějšího obalu (polymerní nosič). Aparatura pro koaxiální elektrospinning vychází ze základní aparatury electrospinningu, rozdíl je pouze v počtu a konstrukci zvlákňovacích trysek. Zvlákňovací trysky tu jsou dvě a navzájem od sebe oddělují vnitřní a vnější tekutinu. Mezi léčivy, která byla již zpracována těmito metodami, jsou látky lipofilní (např. ibuprofen, cefazolin, rifampicin, paclitaxel nebo itraconazol) i látky hydrofilní (např. tetracyklin hydrochlorid).^{24, 25, 28}



Obr. 6: Koaxiální electrospinning.²⁸

Obvazy pro hojení ran

Ideální obvaz je takový, který zajistí na povrchu rány dokonalé podmínky pro její hojení. Dokonalý obvaz by měl splňovat následující podmínky: působit hemostaticky, sloužit jako bakteriální bariéra, absorbovat nadměrné výměšky (exsudát, hněs), udržovat vlhké prostředí a/nebo zajistit přiměřenou výměnu plynů, velikostně odpovídat ráně, měl by být přilnavý ke zdravé tkáni a nepřilnavý k ráně a aplikace by měla být bezbolestná.

Použití obvazů z nanovláknenných textilií má nesporné výhody. Hemostáza je aktivována pouze díky struktuře nanovláknenných materiálů (malé mezery mezi vlákny a obrovský povrch materiálu) bez použití hemostatika. Nanovláknenné materiály mají vynikající savost způsobenou poměrem plochy povrchu ke svému objemu. Další jejich výbornou vlastností je polopropustnost. Takový obvaz je nepropustný pro bakterie a vodu, ale propustný pro plyny, takže zajistí vhodné

prostředí pro vlhké hojení, ochranu před infekcí a dehydratací. Mezi přední vlastnosti těchto obvazů patří jejich skvělá přizpůsobivost, kterou zajišťují lepší pokrytí rány a ochranu proti infekci. Výhodou je, že do nanovlákných krycích materiálů lze začlenit léčiva (antiseptika, antimykotika, vazodilatancia, růstové faktory) a dokonce i buňky (keratinocyty) již při electrospinningu. Tím je docíleno, že všechny složky obvazu jsou v jedné vrstvě na rozdíl od ostatních komerčních obvazů, které musí být vícevrstvé.²⁴

Nanovlákné materiály se též používají ke krytí ran uvnitř těla. Využívají se hlavně k zabránění vzniku nežádoucích srůstů, což následně vede i ke snížení potřebných reoperací. Tyto membrány musí být biodegradabilní a musí mít antiadhezivní účinky.^{16, 24, 26}

Mezi polymery vhodné k výrobě krytí ran patří PCL, PLA, PUR, PVA, PEO, PAA, želatina, algináty, karboxymethylcelulóza, chitosan, kyselina hyaluronová.¹⁶

Implantáty

Vědci se snaží využít výhodných vlastností nanovláken i pro zhotovení tělesných náhrad. Výzkum se zabývá hledáním nanovlákných implantátů pro kosti, chrupavky, cévy, nervovou tkáň, prsní tkáň nebo močový měchýř.

Např. kostní tkáň je nanokompozitní a proto zde nanovlákné implantáty najdou uplatnění. Kromě rozměrové podobnosti s kostní tkání nebo tkání chrupavky vykazují nanomateriály jedinečné povrchové vlastnosti.

Vzhledem k rostoucímu výskytu cévních onemocnění (jako je ateroskleróza), je třeba nahradit poškozené cévy cévními štěpy. Bylo zjištěno, že adheze a proliferace cévních buněk se výrazně zlepšila při použití nanovlákných náhrad ve srovnání s běžně používanými materiály.

6.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HAc) patří do skupiny glykosaminoglykanů. Je to přírodní lineární polysacharid, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek, v nichž jsou kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin spolu spojeny střídavě β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou. In vivo jsou všechny karboxylové skupiny

kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu plně ionizované, proto je molekula vysoce polární a následně vysoce rozpustná ve vodě. Molekula HAc může dosahovat molekulových hmotností až 10^7 Da. Její biologický účinek závisí právě na molekulové hmotnosti. Vyznačuje se výbornými viskoelastickými a reologickými vlastnostmi.^{29, 30}

HAc se nachází v nejhojnějším množství v extracelulární tekutině měkkých pojivových tkáních obratlovců. Lidské tělo o hmotnosti přibližně 60 kg obsahuje asi 12 g HAc. U rostlin, hub a hmyzu chybí. Je produkována fibroblasty, synoviálními, endoteliálními buňkami, buňkami hladké svaloviny a oocyty. Byl pozorován vliv HAc na stárnutí kůže a hojení ran, v kůži působí jako vychytávač volných radikálů. V synoviální tekutině poskytuje potřebnou lubrikaci pro kloub, zastupuje zde funkci jakéhosi tlumiče nárazů, snižuje opotřebení kloubů. HAc hraje důležitou roli v embryogenezi a transdukci signálu.^{29, 30, 31}

6.3.1 Výroba

HAc má několik předností. Dá se získat z různých přírodních zdrojů. Nejvyšší výskyt je v kohoutím hřebínku, lidské pupeční šňůře, synoviální tekutině, dále v hovězí nosní přepážce, lidském sklivci a kůži. Kromě toho je možné ji produkovat různými biotechnologickými postupy, kterými lze získat HAc žádoucí molekulové hmotnosti a biologických vlastností.³¹

Původně se HAc vyráběla ze zvířecích tkání, ve kterých je hojně zastoupena, především z kohoutích hřebínků, kde se nachází v komplexu s proteoglykany. Proto musí být čištěna několika separačními postupy.

Použití HAc živočišného původu pro lidskou terapeutiku se setkala s rostoucím odporem vzhledem k riziku zkřížené virové nebo jinými zprostředkovateli způsobené infekce. Dnes se HAc vyrábí mikrobiální fermentací pomocí oslabených kmenů *Streptococcus zooepidemicus*. Tato produkce ale také není zcela bez rizik vůči lidskému organismu. Hrozí zde nebezpečí mutace bakteriálních kmenů, koprodukce toxinů a mutagenů. Proto se stále hledají alternativní metody produkce HAc zaměřené na zlepšení klíčových parametrů kvality a čistoty.^{31, 32}

A) PRODUKCE KYSELINY HYALURONOVÉ BAKTERIEMI

STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS

Průmyslová výroba HAc začala v roce 1980 pomocí mikroba *Streptococcus zooepidemicus*. Je to gram pozitivní bakterie oválného nebo vejcovitého tvaru, obvykle upořádaná v párech nebo řetězech, které jsou obklopeny rozsáhlým extracelulárním obalem. Bakteriální kolonie produkují HAc jako mukózní průsvitnou vrstvu.^{32,33} Na počátku syntézy stojí glukozo-6-fosfát a fruktozo-6-fosfát, následuje kaskáda biochemických reakcí. Výsledkem kaskády reakcí je HAc spolu s buňkami, které jsou závislé na stejných prekurzorech.

Výrobu pomocí *Streptococcus zooepidemicus* limitují následující faktory:

Vysoká viskozita roztoku 400 – 500 mPa při koncentraci HAc 4 – 5 g/l.

Výskyt stejných prekurzorů (UDP – N – acetyl – glukosamin a UDP – glukuronová kyselina) pro HAc a jiné buňky.

Dalším problémem představuje kyselina mléčná, která je hlavním vedlejším produktem syntézy HAc a která způsobuje inhibici syntézy HAc.²⁹

Streptokoky *Streptococcus zooepidemicus* jsou nutričně náročné bakterie mléčného kvašení. Proto o produkci HAc rozhodují zejména podmínky ve fermentačním médiu. Výtěžnost syntézy zvyšují především aminokyseliny – arginin a lysin, které podporují růst buněk a které si streptokoky neumějí samy syntetizovat.²⁹

Produkci HAc také ovlivňují podmínky kultivace jako je pH, teplota, míra provzdušnění nebo množství rozpuštěného kyslíku. Optimální hodnota pH je 7 a teplota 37 °C. Přítomnost kyslíku výrazně ovlivňuje produkci HAc. Byly popsány výrazné rozdíly při syntéze probíhající za aerobních a anaerobních podmínek. Syntéza při aerobních podmínkách přináší vyšší koncentraci HAc s vyšší molekulovou hmotností.³⁴

Důležitým parametrem pro použití HAc je její molekulová hmotnost. Určuje reologické vlastnosti, ovlivňuje fyziologické reakce a vyjadřuje vhodnost aplikace. Na výslednou molekulovou hmotnost HAc má vliv, zda syntéza probíhá za aerobních či anaerobních podmínek, množství a vhodný poměr poskytnutých prekurzorů (UDP – N – acetyl – glukosamin a UDP – glukuronová kyselina) na počátku syntézy.²⁹

B) PRODUKCE KYSELINY HYALURONOVÉ ALTERNATIVNÍMI MIKROORGANISMY

V současnosti se hledají alternativní mikroorganismy, které by nahradily syntézu HAc prostřednictvím *Streptococcus zooepidemicus*. Tím by se zmírnily obavy plynoucí z bezpečnosti HAc získané tímto patogenním mikroorganismem nebo získané ze živočišných tkání. Jedním ze slibných potenciálních kandidátů je geneticky modifikovaný bakteriální kmen *Bacillus subtilis*. Jeho výhodou je, že se snadno kultivuje ve velkém měřítku, neprodukuje exo- ani endotoxiny a ani nevytváří hyaluronidázu, která by mohla zhoršit syntézu HAc. Mezi další slibné kandidáty patří *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli* nebo *Agrobacterium*.³¹

6.3.2 Využití kyseliny hyaluronové

Díky obrovskému množství fyziologických funkcí a vlastností našla HAc řadu uplatnění v medicíně a kosmetice. Již v roce 1960 uvedla na trh firma Fidia (Itálie) výrobek Hyalgan k léčbě popálenin a kožních vředů.³¹

Využití HAc je závislé na jejích vlastnostech; jednou z nejdůležitějších charakteristik je molekulová hmotnost. HAc s vysokou molekulovou hmotností (větší než 10 kDa) má dobrou viskoelasticitu, schopnost zadržovat vlhkost a výbornou mukoadhezi. Tyto vlastnosti jsou žádoucí při využití v oblasti oftalmologie, ortopedie, hojení ran a kosmetiky. Naproti tomu u derivátů HAc s relativně nízkou molekulovou hmotností (2 - 3,5 kDa) je prokázáno, že podporují angiogenezi, indukují expresi mediátorů zánětu a zastavují růst nádorových buněk.²⁹

OFTALMOLOGIE

HAc je hlavní složkou sklivce oka. Vzhledem ke svým viskoelastickým vlastnostem je klíčovou makromolekulou v očním lékařství. Přípravky s HAc chrání citlivé oční tkáně. Jejich hlavní použití je jako náhrada nebo výměna za tekutinu sklivce ztracenou během operace, např. při operaci šedého zákalu, při implantaci čoček nebo během transplantace rohovky. V současné době jsou k dispozici přípravky s různou molekulovou hmotností HAc i kombinované přípravky např. s chondroitin sulfátem nebo hypromelósou.³¹

HAc je široce využívána v očních kapkách, které slouží jako umělé slzní tekutiny a lubrikant v terapii suchého oka.^{35, 36}

ORTOPEDIE A REVMATOLOGIE

Důležité uplatnění nachází HAc v ortopedii a revmatologii.

Klouby postižené revmatoidní artritidou se stávají tuhé a bolestivé. Revmatoidní artritida je charakterizována jako systémové zánětlivé onemocnění, u kterého je bolest kloubů často doprovázena degenerativními změnami dalších orgánů, např. plic, srdce, krevních cév. V průběhu nemoci je v synoviální tekutině pozorována progresivní degradace polymerních sacharidů, především HAc. Od roku 1980 byla úspěšně použita intraartikulární aplikace HAc odpovídající molekulové hmotnosti k léčbě osteoartrózy a revmatoidní artritidy. Tato léčba vedla ke zlepšení příznaků a snížení užívání nesteroidních antirevmatik.

Léčebný účinek HAc je způsoben obnovou elastických a viskózních vlastností v synoviální tekutině, obnovením endogenní syntézy HAc, stimulací chondrocytů, inhibicí degradace chrupavky a místním analgetickým účinkem.³¹

OTORINOLARYNGOLOGIE

HAc je přítomna i v hlasivkové chrupavce. Zde má díky svým specifickým vlastnostem velký vliv na tloušťku a viskozitu hlasivkové štěrbiny. Deriváty HAc se zde využívají na opravu poškozených nebo poškrábaných hlasivek. Bylo by prospěšné použít deriváty HAc jako lamia propria. Bohužel se zde setkáváme s významným nedostatkem a to, že setrvá v hlasivkách jen krátce (v pokusech na králíčích hlasivkách byl stanoven poločas na 3-5 dnů).

Deriváty HAc se též používají při operacích uší. Přípravky zde podporují hojení bubínku, usnadňují reepitelizaci a zabraňují vzniku srůstů mezi vrstvami sliznice.³¹

DERMATOLOGIE A PLASTICKÁ CHIRURGIE

HAc je jednou ze složek kůže, hraje významnou roli v hydrataci extracelulárního prostoru a představuje matrici na podporu normálních funkcí buněk.³⁷

Zesítněné deriváty HAc jsou dnes již běžně využívanými přípravky v dermatologii a plastické chirurgii k vyplnění obličejových vrásek a jizev. Oproti výrobkům na bázi kolagenu byly prokázány lepší výsledky.³⁰

Katabolismus HAc v kůži je velmi rychlý, poločas je kratší než 24 hodin. Degradace je ovlivněna tepelným účinkem, enzymy a volnými radikály.

Injekční aplikace HAc nepředstavuje prakticky žádné nežádoucí účinky anebo jen zanedbatelné jako je lokální bolest, modřiny, přechodné zarudnutí nebo otok. Výjimečně může hrozit lokální alergická reakce. Výskyt těchto reakcí je nízký, proto není třeba dělat kožní testy.^{37, 38}

CHIRURGIE A HOJENÍ RAN

Deriváty HAc s vysokou molekulovou hmotností se používají lokálně na podporu hojení čerstvých kožních ran. Podporují také léčbu bércových vředů a jiných chronických ran.

Používá se i kombinace s jinými látkami, např. s dexpanthenolem. Tento přípravek se používá pro svůj zvlhčující, antierytematózní a regenerační účinek.

Díky antioxidačnímu účinku HAc se vyrábí i obvazové materiály, kde HAc slouží jako protizánětlivá složka.³¹

6.4 Deriváty hyaluronanu

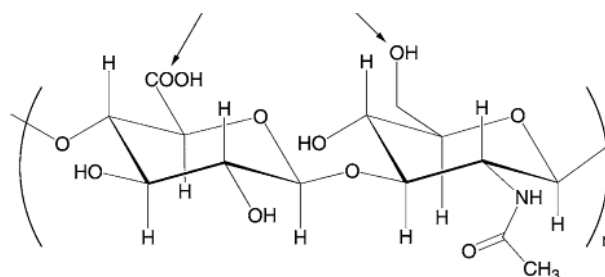
Hyaluronan má unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti a rozličné biologické funkce, je biokompatibilní i biodegradabilní. Nicméně jako obrovskou nevýhodou je jeho rozpustnost ve vodě, díky které je vyloučeno jeho přímé klinické využití. Ve snaze je získávat mechanicky a chemicky stabilnější deriváty, které budou ve vodě nerozpustné. Tyto sloučeniny se mohou ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech výrazně lišit od nativního hyaluronanu.³⁹

Pomocí chemických modifikací lze připravit deriváty různých vlastností. Biokompatibilitu derivátu, rychlost jeho degradace a jeho fyzikální vlastnosti lze

regulovat typem chemické vazby, která připojuje ligand na hyaluronan, výběrem substituentů na ligandu, stupněm substituce, umístěním ligandu na hyaluronan a typem použité síťovací reakce.⁴⁰

6.4.1 Výroba

Většina chemických modifikací se uskutečňuje na karboxylové a hydroxylové skupině cukerné jednotky hyaluronanu.



Obr. 7: Místa chemické modifikace na opakující se disacharidové jednotce.³⁹

Modifikace na karboxylové skupině

Karboxylovou skupinu lze upravit esterifikací nebo pomocí reakce zprostředkované karbodiimidem.

Esterifikace hyaluronanu zahrnuje dvoukrokový postup – přípravu kvarterní soli a následnou reakci s esterifikačním činidlem v aprotickém rozpouštědle při určité teplotě. S vyšším stupněm esterifikace se zvyšuje nerozpustnost připraveného derivátu ve vodě. Estery hyaluronanu jsou využívány v různých odvětvích zdravotnictví.

Karbodiimidy byly již široce využívány pro aktivaci karboxylových skupin glykosaminoglykanů. Takové deriváty jsou prakticky biologicky neodbouratelné a představují jednu z možností, jak připravit deriváty hyaluronanu v organismu velmi stabilní.⁴⁰ Po aktivaci nastává nukleofilní atak karboxylátových aniontů na centrálním uhlíku a vzniká meziprodukt O-acylisourea. Ten může být zadržen nukleofily nebo se může přeskupit na nereaktivní N-acylureu. Modifikace hyaluronanu zprostředkovaná karbodiimidem je obvykle prováděna při pH 4-6, kdy

jsou dusíky karbodiimidu dostatečně protonovány, zatímco hyaluronan se vyskytuje ve vyrovnaném poměru protonovaných a neprotonovaných skupin.³⁹

Modifikace na hydroxylové skupině

Hydroxylovou skupinu hyaluronanu lze obměnit sulfatací. Díky této změně získáme molekulu, která nepodléhá rozkladu hyaluronidázou ani chondroitinázou, vykazuje nižší cytotoxicitu a dobrou buněčnou kompatibilitu. Sulfatací lze získat sloučeniny s výhodnými vlastnostmi, které se dají použít k potažení povrchu zdravotnických prostředků. Takto upravený povrch vykazuje výbornou kompatibilitu s krví, je antitrombogenní, je snížena adheze buněk a bakteriální růst k povrchu materiálu.³⁹

Další úpravou hydroxylové skupiny je její esterifikace. Estery z hyaluronanu, ve kterých je z hyaluronanu využita právě primární či sekundární hydroxylová skupina lze připravit klasickou reakcí, při kterých je jako reagent využíván chlorid nebo symetrický anhydrid mastné kyseliny. Použijí-li se k esterifikaci vyšší mastná kyselina, je možné připravit deriváty hyaluronanu, jehož molekula bude mít změněnou rozpustnost ve vodě a zvýšenou tendenci interagovat s hydrofobními molekulami přítomnými v jejím okolí. Připravit lze až hyaluronan, který tvoří ve vodných roztocích micelám podobné útvary, a může být tudíž využit při přípravě nosičů schopných transportovat lipofilní substance. Lze rovněž připravit ve vodě zčásti nebo zcela nerozpustný derivát, který najde uplatnění v tkáňovém inženýrství, např. při tvorbě různých biologicky velmi odolných, avšak stále biodegradabilních struktur, při tvorbě nano i mikrovláken použitelných pro přípravu krytů ran, jako nosič léků pro jejich cílenou distribuci a řízené uvolňování.⁴⁰ Hydroxylová skupina hyaluronanu byla esterifikována kyselinou máselnou, která je známa tím, že umí vyvolat buněčnou diferenciaci a zastavit růst některých druhů lidských nádorů. Hyaluronan-butyrát tak nabízí nový systém dodávky léčiv, který je cíleně zaměřený na nádorové buňky.³⁹

Jinou obměnou hydroxylové skupiny hyaluronanu je její etherifikace. Z takto připravených derivátů se připravují hydrogely.

Deriváty hyaluronanu se dají též připravit spojením s močovinou nebo řetězovou oxidací.³⁹

Ostatní chemické modifikace hyaluronanu

Jendou z dalších možných obměn je upravení koncové struktury. Hyaluronan má pouze jediné možné místo na N-acetylglukosaminu na konci molekuly pro připojení jiné molekuly. Toho bylo již využito v proléčivech nebo k označování látek při použití v biomateriálech. To, že se zde nachází pouze jediné místo možné k modifikaci, značně omezuje rozšiřovací a síťovací možnosti hyaluronanu. Redukční konec hyaluronanu o nízké molekulové hmotnosti lze kovalentně spojit redukční aminací s aminoskupinou v poly-L-lysinu ve výsledný kopolymer.

Hydrazinolýzou N-acetyl-skupiny hyaluronanu vzniknou volné glukosaminové části, které mohou být využity pro další spojovací reakce. Nicméně hydrazinolýza musí být prováděna v bazickém prostředí při vysoké teplotě (100°C) a tím je způsobena značná degradace molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Další možnou modifikací hyaluronanu je štěpná polymerace pomocí N-isopropylakrylamidu. Takto vzniklé deriváty ovšem vykazují špatnou biodegradabilitu, ta jim brání v použití k regeneraci tkání.³⁹

6.5 Sorpční vlastnosti nanovláknenných materiálů

Sorpce je schopnost materiálu přijímat kapalinu, buď na svém povrchu (adsorpce) nebo kapalina může pronikat do celé struktury materiálu (absorpce). Vyjadřuje se jako nasákavost N , tj. hmotnost sorbované kapaliny vztažená na gram materiálu (g/g).

Nanovláknenné materiály mají vynikající savost způsobenou poměrem plochy povrchu ke svému objemu a schopnost zadržovat kapalinu v pórech mezi vlákny. Tyto materiály vytvářejí prostorovou síť, která je schopna bobtnat, tedy přijímat kapalinu mezi své makromolekulární řetězce. Sorpce je vyvolána rozdílem osmotického tlaku uvnitř a vně nanovláken.

Na rozdíl od syntetických nanovláknenných materiálů, vykazují nanovláknena derivátu hyaluronanu specifické výhody, jako je vynikající biokompatibilita a biologická rozložitelnost.

Na nasákavost nanovláknenných materiálů má vliv jeho zesítnění. Čím intenzivnější zesítnění je, tím se zmenšují volné prostory mezi nanovláknny, nanovláknena nemají prostor na zvětšování svého objemu a v důsledku toho je snížena i nasákavost.^{41, 42, 43}

Nasákačí schopnost nanovláknenných materiálů také ovlivňuje iontová síla nasákačího media. Snížení bobtnavosti je přičítáno rozdílu osmotického tlaku mezi materiálem a nasákačím médiem. Čím vyšší má nasákačí médium osmotický tlak, tím se snižuje schopnost nanovláknenného materiálu absorbovat kapalinu. Přítomnost valenčních kationtů v roztoku také ovlivňuje schopnost vázat molekuly vody.^{41, 42, 43, 44}

Zkoušky nasákačích schopností nanovláknenného materiálu se provádějí gravimetricky. Všechny postupy jsou založené na určení hmotnosti kapaliny (nasákačího média), která je absorbována nanovláknny za určitý čas.

U zkoušky s nálevovým sáčkem je v sáčku uzavřen vzorek s definovanou hmotností, který se určitý čas máčí v nasákačím médiu. Přebytečná kapalina se nechá předem stanovenou dobu odkapat. Sáček se zváží a vypočítá se nasákavost.^{41, 43}

Zkouška metodou volného bobtnání se provádí tak, že se odebere určité množství nanovláknenného materiálu, ponoří se do definovaného objemu kapaliny, kde se nechá jistou dobu máčet. Poté se filtruje přes nálevku ze slinutého skla s póry definované velikosti. Filtrace probíhá určitou dobu. Kapalina, která prošla přes filtr, se zváží a hmotnost kapaliny absorbované ve vláknech se vypočítá odečtením. Vše se provádí při předem definované teplotě a relativní vzdušné vlhkosti.^{1, 42, 45, 46}

Také se provádějí zkoušky na množství uvolněné kapaliny, kdy na materiál s absorbovanou kapalinou působí určitý tlak určitou dobu.^{41, 42}

7 Experimentální část

7.1 Použité suroviny

HA (deriváty hyaluronanu) - Contipro Group s.r.o., Česká republika

Polyethylenoxid 400 000, p.a – Scientific Polymer Products, Inc., USA

Čištěná voda - Contipro Group s.r.o., Česká republika

Chlorid sodný, p.a - Lach-Ner,s.r.o., Česká republika

Aquacel – komerční přípravek, ConvaTec, UK

7.2 Použité přístroje

Třepačka, C2 Shaker, (New Brunswick Scientific, Česká republika)

Reometr Rotr – 01, typ AR-G2, (Amedis, spol. s.r.o., Česká republika)

Tenziometr Krüss K9, (Krüss, Německo)

Konduktometr inoLab Cond, (WTW, s.r.o., Česká republika)

Vývojový model zařízení 4SPIN® C4S LAB1, (Contipro, Česká republika)

UV crosslinker CL-1000, (UVP, USA)

Analytické váhy XS 205M, (Mettler-Toledo, s.r.o., Česká republika)

Elektronový mikroskop VEGA\\LSU, (Tescan, Česká republika)

7.3 Použité metody

7.3.1 Příprava roztoků hyaluronanu

Připravila jsem cca 400 g vodných roztoků derivátu hyaluronanu (HA) a polyethylenoxidu 400 000 (PEO) v poměru 80:20. Celková koncentrace směsi v roztoku byla 6 %. Vzorke roztoků jsem označila 1HA a 2HA

Postupovala jsem tak, že jsem navázila na analytických váhách s přesností na 0,01 g derivát hyaluronanu a polyethylenoxid 400 000 do skleněné širokohrdlé lékovky, dovážila jsem čištěnou vodou do požadované hmotnosti a baňku umístila na třepačku. Směs jsem nechala mísit do druhého dne do úplného rozpuštění pevných složek.

U připravených roztoků jsem následně změřila jejich charakteristiky – povrchové napětí, vodivost a viskozitu.

7.3.2 Měření povrchového napětí

Povrchové napětí vzorků jsem měřila tenziometrem Krüss K9. Tenziometr jsem zapnula jednu hodinu před začátkem měřením, aby došlo ke kalibraci přístroje. Wilhelmyho destičku o rozměrech 1,9 cm x 0,9 cm jsem vyjmula z dřevěného pouzdra a očistila ji isopropylalkoholem a čistou vodou a vyžihala nad plynovým kahanem. Poté jsem ji nasadila na háček tenziometru a nechala ji 2 minuty vychladnout.

Nádobku tenziometru jsem naplnila měřeným vzorkem. Podle pokynů výrobce jsem provedla nastavení nulové polohy pomocí rysek. Přístroj jsem vynulovala a zahájila vlastní měření. Po patnácti minutách jsem odečetla naměřenou hodnotu povrchového napětí na displeji tenziometru.

Měření jsem prováděla třikrát u obou vzorků. Naměřené hodnoty povrchového napětí a teploty, při nichž měření probíhalo, jsou uvedeny v Tab. 2.

7.3.3 Měření vodivosti

Vodivost vzorků jsem měřila pomocí konduktometru inoLab Cond. Elektrodu konduktometru jsem důkladně očistila izopropylalkoholem a čistou vodou. Roztok jsem nalila do kádinky a ponořila do něj elektrodu. Měření probíhalo 2 minuty při teplotě 20-25°C. Po uplynutí času jsem si poznamenala hodnotu z displeje přístroje. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 2.

7.3.4 Měření viskozity

Viskozitu jsem měřila na rotačním reometru Rotr-01, typ AR-G2, s pomocí programu Reology Advantage Instrument Control AR.

K reometru jsem připevnila nástavec s kruhovou deskou sériového čísla 987119 o průměru 60 mm a nastavila jsem požadované parametry měření. Viskozitu jsem měřila při teplotě $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ s geometrií deska – deska, při rychlostním spádu 0,1 – 5000 s⁻¹ po dobu 3 minut s intervalem změny smykové rychlosti 3 sekundy.

Reometr jsem nechala 5 minut temperovat. Na spodní desku přístroje jsem injekční stříkačkou aplikovala 1 mililitr roztoku prostý vzduchových bublin a spustila jsem vlastní měření. Pro každý vzorek (1HA a 2HA) jsem provedla měření třikrát. Mezi jednotlivými měřeními jsem vždy důkladně očistila měřicí plochu reometru i nástavec. Před jednotlivými měřeními se nástavec musí nechat vytemperovat. Naměřená data byla zpracována v počítačovém programu Excel. Naměřené hodnoty viskozity a reogramy jsou uvedeny v Tab. 3 a 4 a na Obr. 8 - 11.

7.3.5 Příprava nanovláken zvlákňováním

Roztoky jsem zvlákňovala na vývojovém modelu zařízení 4SPIN® C4S LAB1 principem elektrostatického zvlákňování při teplotě $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a relativní vlhkosti vzduchu $15,5 \pm 0,5 \%$. Do zvlákňovací komory zařízení jsem umístila elektrody a nastavila jsem jejich vzdálenost na 20 cm. Jako zvlákňovací elektrodu jsem použila lineární bezjehlovou multitrysku, jako sběrnou elektrodu uzemněnou nerezovou desku.

Do plastové stříkačky jsem naplnila část roztoku a pomocí plastových hadiček jsem spojila stříkačku se zvlákňovací elektrodou a dávkovacím zařízením. Na dávkovacím zařízení jsem nastavila rychlost dávkování roztoku do trysky a rychlost proudění vzduchu na $53 \text{ m}^3/\text{hod}$. Pro zvlákňování vzorku 1HA jsem použila napětí 82 kV, pro zvlákňování vzorku 2HA 60 kV.

Po zapnutí zařízení jsem nechala roztok zvlákňovat do vytvoření celistvé nanovlákněné vrstvy na sběrné elektrodě, což trvalo přibližně 2 hodiny. Poté jsem nanovlákněnou vrstvu opatrně sejmula z elektrody a uzavřela do mikrotenového sáčku. Sběrnou elektrodu jsem umyla detergentem pod tekoucí vodou, opláchla izopropylalkoholem a čistěnou vodou a nechala oschnout na vzduchu nebo v sušárně. Celý postup zvlákňování jsem opakovala tolikrát, dokud nebyl všechn roztok zvlákněn.

7.3.6 Zesíťení nanovláken

Nanovlákněnou vrstvu jsem opatrně přesunula na silikonový papír a nastříhala tvarovými kleštěmi na vzorky tvaru kruhu stejné velikosti. Odstranila jsem

silikonový papír a vzorky jsem vystavila UV-záření v zařízení UV crosslinker CL-1000 po dobu deseti nebo šedesáti minut.

7.3.7 Obrazová analýza

Hodnotila jsem nezesíťené vzorky a vzorky zesíťené po dobu 10 minut a 60 minut. Vzorky byly analyzovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu VEGA\\LSU firmy Tescan, snímány SE detektorem (sekundární elektrony) při urychlovací napětí HV=10kV ve vysokém vakuu, módu RESOLUTION při zvětšení 500x, 100000x a 1000000x. Poté byly objekty proměřeny pomocí počítačového programu NIS – Elements AR 3.1. Průměr vláken jsem měřila 50x u každého vzorku při zvětšení 10000x. Vybrala jsem padesát takových vláken, která byla ostře zobrazena a která se nerozdvojovala a ani nebyla jinak znehodnocena. Naměřené hodnoty byly převedeny do počítačového programu Excel. Výsledky obrazové analýzy a naměřené hodnoty průměru vláken jsou uvedeny v Tab. 5 a na Obr. 12 a 13.

7.3.8 Měření nasákavosti

Měření nasákavosti jsem prováděla gravimetricky metodou volného bobtnání, jejíž postup jsem čerpala z patentu číslo WO 93/12275 A1.¹ Postup měření nasákavosti pomocí metody volného bobtnání je následující. 0,5 g vláken se disperguje ve 30 ml vody nebo fyziologického roztoku a máčí se po dobu pěti minut při relativní vzdušné vlhkosti 65% a teplotě 20°C. Poté se filtruje přes nálevku ze slinutého skla s póry velikosti 100-160 µm. Filtrace probíhá pět minut. Kapalina, která prošla přes filtr, se zváží a hmotnost kapaliny absorbované ve vláknech se vypočítá odečtením.¹

Měřila jsem nasákavost vzorků derivátů hyaluronanu a porovnávala ji s komerčním výrobkem Aquacel.

Protože jsem nemohla splnit podmínky týkající se relativní vzdušné vlhkosti a teploty, prováděla jsem měření vždy při teplotě $23,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a relativní vzdušné vlhkosti $33 \pm 2\%$. Postupovala jsem tak, že asi 0,2000 g vláknenného materiálu jsem ponořila do $15 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ čištěné vody nebo do $15 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ 0,9% roztoku chloridu sodného. Požadovanou hmotnost vzorku 0,2 g jsem získala vrstvením jednotlivých

výstrižků nanovlákněné vrstvy na sebe. Po pěti minutách jsem celý obsah kádinky opatrně přelila na skleněnou fritu s póry velikosti 100-160 μm , směs filtrovala samovolně působením gravitace pět minut do vytárované kádinky a poté jsem kádinku s filtrátem zvážila. Vypočítala jsem hmotnost absorbované kapaliny. Učinila jsem též srovnávací zkoušku s 0,5 g vzorku ve $30 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ čištěné vody.

Pro další hodnocení vlastností materiálu, vyjádření plošné hmotnosti a nasákavosti jsem určila plochu vzorků. Vzorky derivátu hyaluronanu měly tvar kruhu. Jejich plochu jsem vypočítala podle vzorce:

$$S = \pi r^2 \quad (1)$$

Vzorky Aquacelu byly čtvercové s délkou strany 5 cm. Jejich plochu jsem vypočítala pomocí vzorce:

$$S = a^2 \quad (2)$$

Ve výsledkových tabulkách jsou používané symboly, jejichž vysvětlení je uvedeno v následující tabulce.

Tab. 1: Symboly použité u zkoušky nasákavosti.

Plošná hmotnost	$m \text{ (g/m}^2\text{)}$
Hmotnost vzorku	$m_0 \text{ (g)}$
Hmotnost kapaliny před absorpcí	$m_{K0} \text{ (g)}$
Hmotnost kapaliny po absorpci	$m_{K1} \text{ (g)}$
Hmotnost absorbované kapaliny ($m_{K0} - m_K$)	$m_1 \text{ (g)}$
Nasákavost (m_1/m_0)	$N \text{ (g/g)}$
Plocha vzorků der. hyaluronanu (m^2)	0,0020
Plocha vzorků Aquacelu (m^2)	0,0025

Pro přehlednost a zjednodušení jsem vzorky označila kódem, ve kterém mají symboly následující význam.

1HA; 2HA	Kód derivátu hyaluronanu
0; 10; 60	Doba zesítní nanovláken UV zářením
V; F	Čištěná voda; 0,9% roztok NaCl
Číslo	Číslo vzorku

Např. 1HA10V1-9 znamená, že se jedná o derivát 1HA, na který působilo UV záření 10 minut, pokus byl prováděn v čištěné vodě. Číselné označení 0 znamená, že byl použit derivát, který neprošel procesem zesítní v UV záření.

Naměřené výsledky jsou shrnuty v Tab. 6 – 14.

7.3.9 Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení vlivu nasávacího media a rozdíl mezi polymery (HA, Aquacel) byla využita 2-faktorová analýza rozptylu (ANOVA) v programu Excel. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15.

8 Výsledky

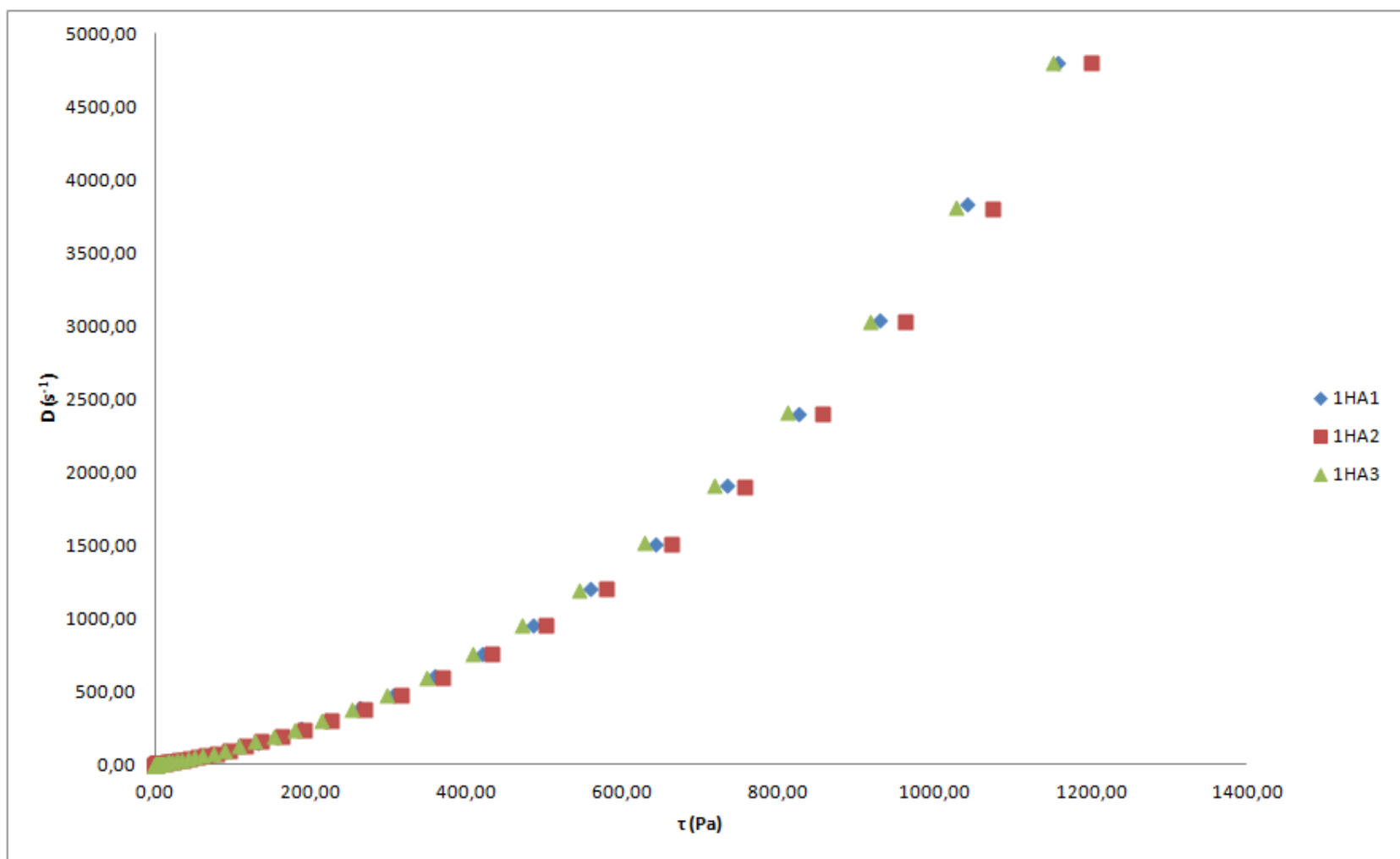
Tab. 2: Výsledky měření povrchového napětí σ a elektrické vodivosti G vzorků 1HA1-3 a 2HA1-3 při teplotě 20-25°C.

	σ (mN·m ⁻¹)		G (mS·cm ⁻¹)	
	1HA	2HA	1HA	2HA
1	61,30	61,90	4,55	4,08
2	61,40	62,90	4,56	4,11
3	61,20	62,00	4,55	4,12
Průměr	61,30	62,27	4,55	4,10
SD	0,10	0,55	0,01	0,02

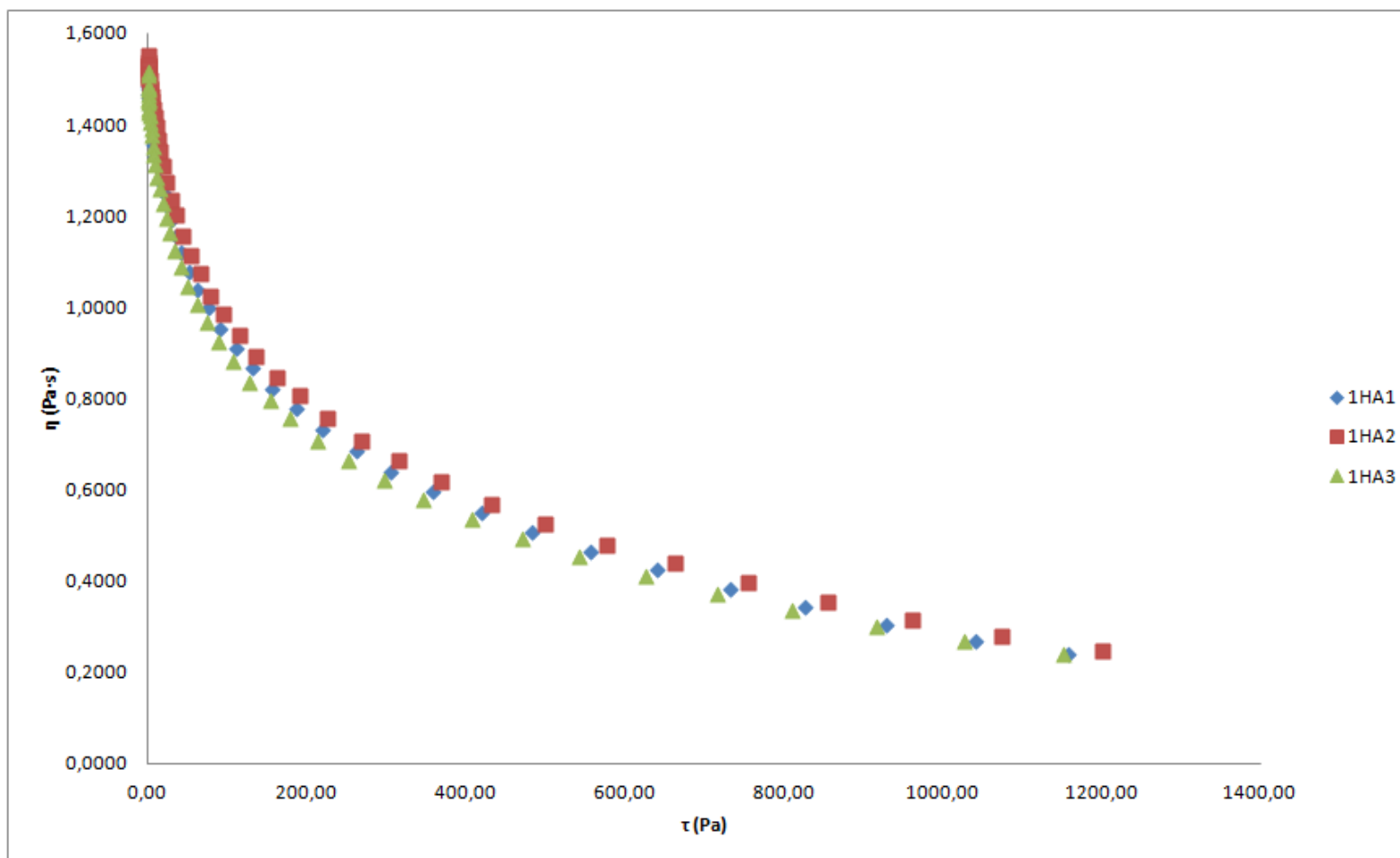
Tab. 3: Výsledky měření viskozity vzorků 1HA1-3.

1HA1			1HA2			1HA3		
$D \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\tau \text{ (Pa)}$	$\eta \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$	$D \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\tau \text{ (Pa)}$	$\eta \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$	$D \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\tau \text{ (Pa)}$	$\eta \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$
0,12	0,18	1,5170	0,12	0,19	1,5390	0,12	0,18	1,5180
0,15	0,23	1,5100	0,15	0,24	1,5540	0,15	0,23	1,5110
0,19	0,29	1,4970	0,19	0,29	1,5040	0,19	0,28	1,4780
0,24	0,36	1,5000	0,24	0,37	1,5310	0,24	0,36	1,4830
0,31	0,45	1,4810	0,30	0,47	1,5300	0,30	0,45	1,4840
0,39	0,57	1,4840	0,38	0,59	1,5320	0,38	0,56	1,4690
0,48	0,70	1,4670	0,48	0,73	1,5240	0,48	0,70	1,4560
0,60	0,89	1,4850	0,60	0,91	1,5230	0,60	0,88	1,4560
0,76	1,13	1,4780	0,76	1,15	1,5100	0,76	1,11	1,4580
0,95	1,40	1,4680	0,94	1,43	1,5110	0,94	1,36	1,4490
1,20	1,75	1,4590	1,19	1,79	1,5020	1,19	1,71	1,4370
1,52	2,20	1,4470	1,51	2,26	1,4980	1,51	2,16	1,4300
1,90	2,73	1,4370	1,91	2,83	1,4810	1,90	2,71	1,4220
2,4	3,43	1,4220	2,4	3,57	1,4780	2,4	3,40	1,4070
3,0	4,29	1,4100	3,0	4,44	1,4640	3,0	4,23	1,3910
3,8	5,32	1,3960	3,8	5,58	1,4530	3,8	5,27	1,3770
4,8	6,61	1,3780	4,8	6,92	1,4360	4,8	6,53	1,3550
6,0	8,19	1,3560	6,0	8,56	1,4160	6,1	8,11	1,3370
7,6	10,2	1,3330	7,6	10,6	1,3950	7,6	10,1	1,3140
9,6	12,6	1,3070	9,7	13,2	1,3690	9,6	12,4	1,2870
12,1	15,5	1,2800	12,2	16,3	1,3410	12,1	15,3	1,2600
15,2	19,0	1,2540	15,3	20,0	1,3110	15,3	18,7	1,2280
19,2	23,5	1,2260	19,3	24,6	1,2760	19,2	23,0	1,1980
24,2	28,9	1,1940	24,2	29,9	1,2370	24,2	28,2	1,1630
30,4	35,2	1,1580	30,4	36,6	1,2030	30,6	34,4	1,1240
38,2	42,8	1,1210	38,6	44,7	1,1590	38,5	42,0	1,0900

1HA-1			1HA2			1HA3		
D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)
48,3	52,1	1,0780	48,4	54,0	1,1160	48,5	50,7	1,0460
60,7	63,2	1,0400	61,1	65,6	1,0740	61,0	61,5	1,0080
76,3	76,3	0,9997	76,9	78,9	1,0250	76,8	74,3	0,9681
96,3	91,9	0,9546	96,2	94,9	0,9865	96,7	89,6	0,9267
121,3	110,6	0,9118	122,1	114,8	0,9397	121,8	107,6	0,8835
152,7	132,5	0,8677	153,1	137,0	0,8943	153,8	128,7	0,8373
191,8	157,5	0,8213	192,9	163,6	0,8484	192,4	153,5	0,7977
241,4	187,9	0,7781	236,0	190,4	0,8070	237,1	179,8	0,7582
299,4	219,9	0,7345	298,9	226,7	0,7586	299,8	212,9	0,7101
382,6	262,4	0,6859	379,6	269,6	0,7101	379,6	253,3	0,6674
475,9	305,4	0,6418	474,9	315,7	0,6649	477,7	298,0	0,6238
600,9	358,4	0,5965	596,4	368,5	0,6179	598,0	347,2	0,5805
760,0	419,1	0,5514	758,9	432,6	0,5701	759,9	407,3	0,5360
952,5	484,1	0,5083	949,0	500,5	0,5274	950,4	471,2	0,4958
1200,0	558,0	0,4652	1199,0	578,4	0,4822	1194,0	543,3	0,4552
1506,0	641,0	0,4256	1508,0	663,0	0,4396	1514,0	627,1	0,4143
1910,0	732,7	0,3836	1895,0	755,2	0,3985	1911,0	717,0	0,3752
2397,0	826,0	0,3446	2404,0	855,2	0,3557	2405,0	811,3	0,3374
3039,0	928,7	0,3056	3031,0	961,4	0,3172	3034,0	916,9	0,3022
3835,0	1042,0	0,2716	3805,0	1074,0	0,2823	3816,0	1028,0	0,2695
4799,0	1158,0	0,2413	4804,0	1201,0	0,2500	4804,0	1152,0	0,2399



Obr. 8: Reogramy vzorků 1HA1-3

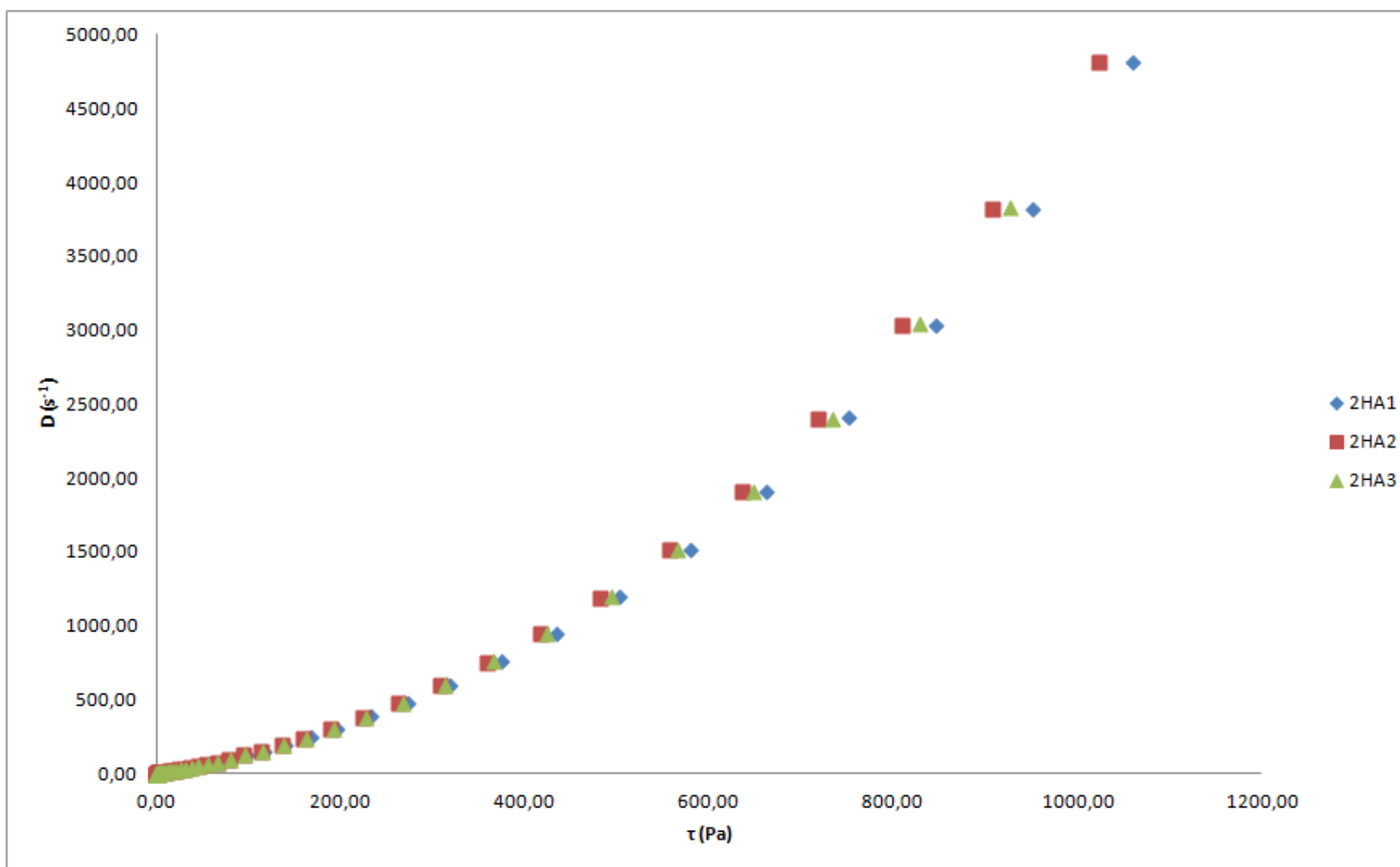


Obr. 9: Viskozitní křivka vzorků 1HA1-3

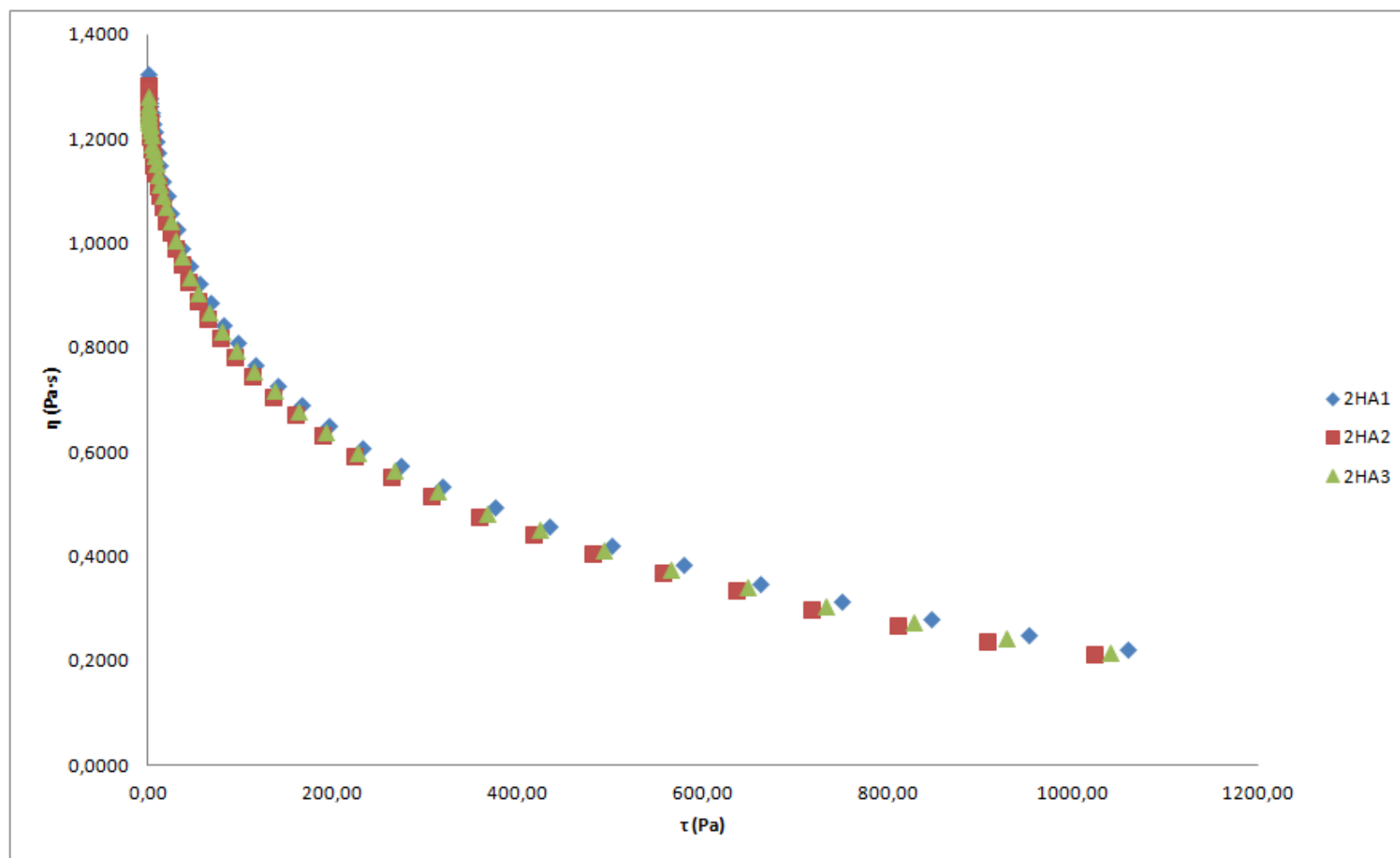
Tab. 4: Výsledky měření viskozity vzorků 1HA1-3.

2HA1			2HA2			2HA3		
D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)
0,12	0,16	1,3010	0,12	0,16	1,2820	0,12	0,15	1,2650
0,15	0,19	1,2690	0,15	0,20	1,2960	0,15	0,20	1,2800
0,19	0,26	1,3220	0,19	0,25	1,2870	0,19	0,24	1,2440
0,24	0,31	1,2990	0,24	0,31	1,2920	0,24	0,30	1,2570
0,30	0,40	1,3050	0,31	0,40	1,3020	0,31	0,38	1,2470
0,38	0,49	1,2930	0,38	0,49	1,2930	0,38	0,48	1,2530
0,47	0,61	1,3050	0,48	0,62	1,2940	0,47	0,58	1,2360
0,59	0,77	1,2930	0,60	0,76	1,2770	0,59	0,74	1,2440
0,76	0,98	1,2880	0,76	0,96	1,2620	0,76	0,94	1,2420
0,94	1,21	1,2830	0,95	1,20	1,2550	0,94	1,17	1,2380
1,19	1,52	1,2820	1,20	1,49	1,2420	1,19	1,47	1,2310
1,52	1,94	1,2770	1,51	1,86	1,2300	1,52	1,87	1,2280
1,91	2,43	1,2680	1,91	2,32	1,2130	1,917	2,35	1,2240
2,4	3,04	1,2630	2,4	2,89	1,2030	2,4	2,93	1,2150
3,0	3,79	1,2500	3,0	3,62	1,1930	3,0	3,68	1,2080
3,8	4,74	1,2420	3,8	4,51	1,1790	3,8	4,56	1,1880
4,8	5,89	1,2280	4,8	5,64	1,1650	4,8	5,70	1,1790
6,0	7,34	1,2140	6,1	6,98	1,1500	6,1	7,14	1,1680
7,7	9,14	1,1940	7,6	8,65	1,1320	7,7	8,84	1,1510
9,6	11,3	1,1730	9,6	10,7	1,1090	9,7	10,9	1,1310
12,1	13,9	1,1480	12,2	13,2	1,0890	12,2	13,5	1,1120
15,3	17,1	1,1190	15,3	16,4	1,0680	15,3	16,7	1,0910
19,2	21,0	1,0900	19,3	20,1	1,0400	19,3	20,6	1,0680
24,3	25,7	1,0580	24,2	24,7	1,0190	24,2	25,2	1,0410
30,5	31,3	1,0270	30,6	30,3	0,9896	30,6	30,7	1,0040
38,4	38,0	0,9895	38,4	36,8	0,9576	38,4	37,4	0,9741
48,2	46,1	0,9558	48,4	44,7	0,9239	48,3	45,2	0,9354

2HA1			2HA2			2HA3		
D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)	D (s ⁻¹)	τ (Pa)	η (Pa·s)
60,9	56,1	0,9211	61,0	54,3	0,8899	60,7	54,9	0,9049
76,6	67,7	0,8843	76,5	65,4	0,8548	76,6	66,4	0,8676
96,7	81,5	0,8431	96,5	79,0	0,8187	96,1	79,8	0,8311
121,5	98,1	0,8075	121,3	94,6	0,7799	121,2	96,1	0,7927
152,7	116,9	0,7652	152,4	113,4	0,7440	152,5	115,1	0,7548
192,6	140,1	0,7275	192,0	135,5	0,7057	191,8	137,3	0,7162
242,1	167,2	0,6906	238,1	159,5	0,6698	239,9	162,7	0,6782
301,9	196,0	0,6491	299,7	189,0	0,6304	301,8	192,1	0,6364
383,2	233,1	0,6082	378,0	223,4	0,5910	381,8	227,9	0,5968
475,8	273,0	0,5739	474,9	262,8	0,5533	475,3	267,6	0,5631
596,3	318,8	0,5346	597,9	307,4	0,5142	599,0	313,6	0,5236
759,2	375,2	0,4942	753,5	358,5	0,4759	760,5	366,7	0,4822
946,9	433,5	0,4578	946,0	416,7	0,4405	944,8	424,6	0,4494
1194,0	501,8	0,4204	1190,0	481,8	0,4047	1200,0	493,1	0,4110
1515,0	580,0	0,3829	1511,0	556,2	0,3681	1509,0	566,3	0,3752
1909,0	662,7	0,3471	1910,0	636,4	0,3332	1908,0	648,2	0,3397
2407,0	750,7	0,3119	2402,0	717,8	0,2989	2403,0	733,4	0,3051
3032,0	846,5	0,2792	3028,0	810,1	0,2675	3041,0	827,7	0,2722
3823,0	951,8	0,2490	3816,0	907,5	0,2378	3826,0	927,5	0,2424
4809,0	1060,0	0,2204	4817,0	1023,0	0,2124	4836,0	1040,0	0,2150



Obr. 10: Reogram vorků 2HA1-3

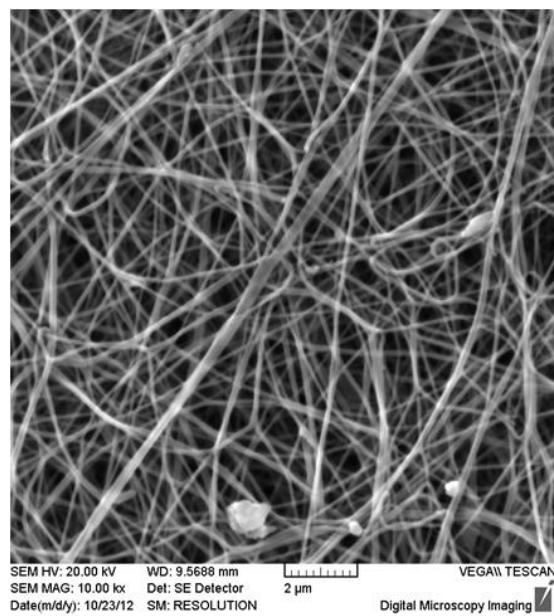


Obr. 11: Viskozitní křivka vzorků 2HA1-3

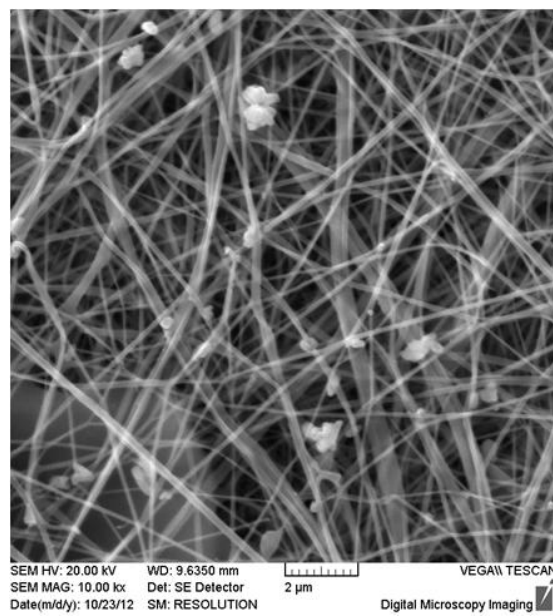
Tab. 5: Průměr vláken v nanometrech vzorků 1HA po působení UV záření 0, 10 a 60 minut a vzorků 2HA po působení UV záření 0 a 60 minut.

	1HA			2HA	
	UV (min)				
	0	10	60	0	60
1	162,34	133,91	134,98	158,88	192,59
2	125,69	76,59	115,31	106,20	160,25
3	166,85	126,26	83,89	149,03	125,04
4	125,06	137,17	97,68	128,62	98,49
5	134,99	97,00	127,54	153,02	119,43
6	143,95	82,17	133,83	81,49	98,49
7	116,31	89,27	170,80	102,91	210,42
8	117,99	67,37	141,78	91,11	145,30
9	160,15	97,00	124,13	128,84	107,37
10	131,46	84,83	124,13	111,71	148,80
11	118,64	136,78	139,82	143,94	100,78
12	143,96	86,76	97,67	214,13	124,59
13	159,41	131,83	123,82	134,71	100,78
14	116,31	67,37	75,55	88,56	140,52
15	126,61	94,69	118,65	124,09	128,64
16	110,80	109,84	71,29	151,32	171,25
17	100,83	107,30	107,94	162,97	145,31
18	112,56	116,21	138,43	95,70	172,25
19	203,60	76,60	118,98	106,19	167,22
20	137,57	126,69	132,66	142,75	101,34
21	131,47	134,74	117,99	139,10	140,52
22	111,85	119,96	106,49	92,36	179,07
23	118,65	128,42	115,30	101,79	128,64
24	132,65	107,30	94,01	121,06	151,07
25	116,32	150,65	107,94	138,06	90,67
26	123,80	143,10	124,13	110,16	115,14

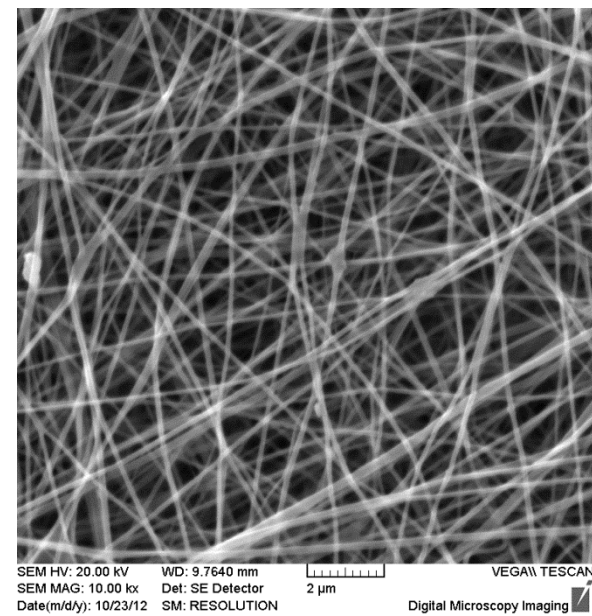
	1HA			2HA	
	UV (min)				
	0	10	60	0	60
27	143,96	123,14	106,49	91,42	204,07
28	131,46	126,69	107,58	86,26	103,32
29	118,98	76,59	168,95	114,50	133,71
30	112,56	66,54	234,46	146,91	104,10
31	123,17	76,59	110,80	124,79	148,35
32	106,49	148,79	112,82	189,14	142,48
33	98,88	126,69	148,96	139,10	113,22
34	197,75	119,96	138,38	133,86	99,51
35	126,61	80,13	118,65	128,84	106,97
36	122,86	104,15	150,09	134,71	119,83
37	88,43	146,16	153,07	181,78	194,68
38	131,47	76,59	174,07	172,72	77,43
39	147,19	103,62	127,36	145,55	105,42
40	118,64	155,34	129,11	154,33	142,68
41	113,25	78,41	150,09	154,59	79,88
42	126,61	122,73	138,38	128,38	173,16
43	106,11	88,11	202,76	143,53	115,39
44	100,05	126,43	110,80	204,02	86,50
45	126,62	166,34	114,30	103,51	120,74
46	106,49	99,95	134,24	122,14	106,98
47	90,19	161,17	132,98	174,39	178,33
48	100,83	140,55	150,09	156,19	126,75
49	131,47	96,84	90,68	118,37	123,44
50	151,38	150,83	157,78	129,03	127,61
Průměr	127,43	111,84	128,15	133,14	131,97
SD	23,42	27,86	6407,63	30,24	32,97
Minimum	88,43	66,54	71,29	81,49	77,43
Maximum	203,60	166,34	234,46	214,13	210,42



a

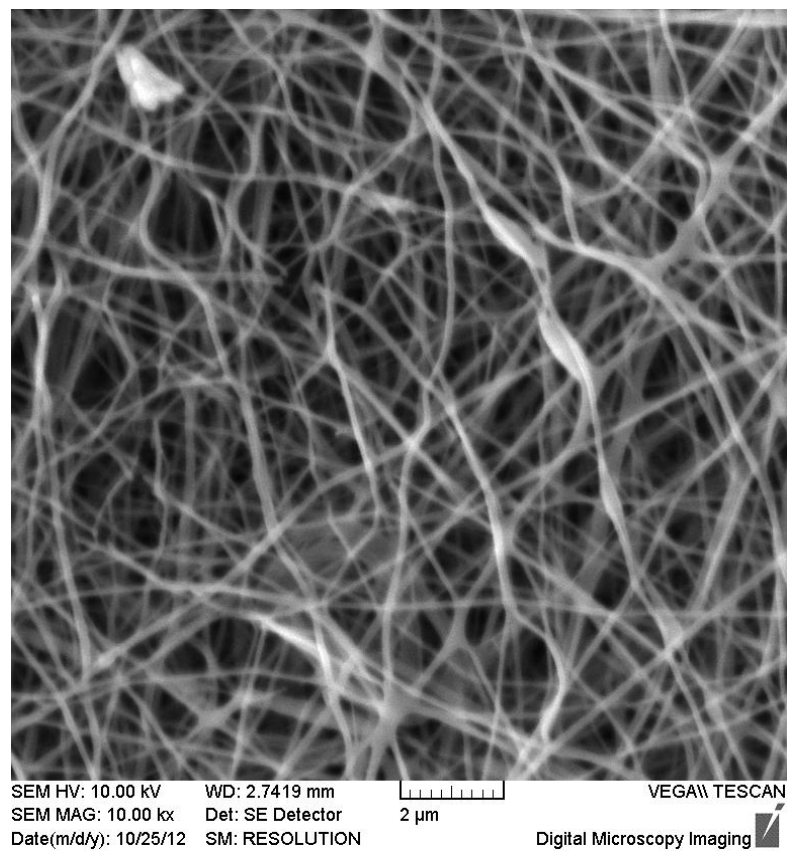


b

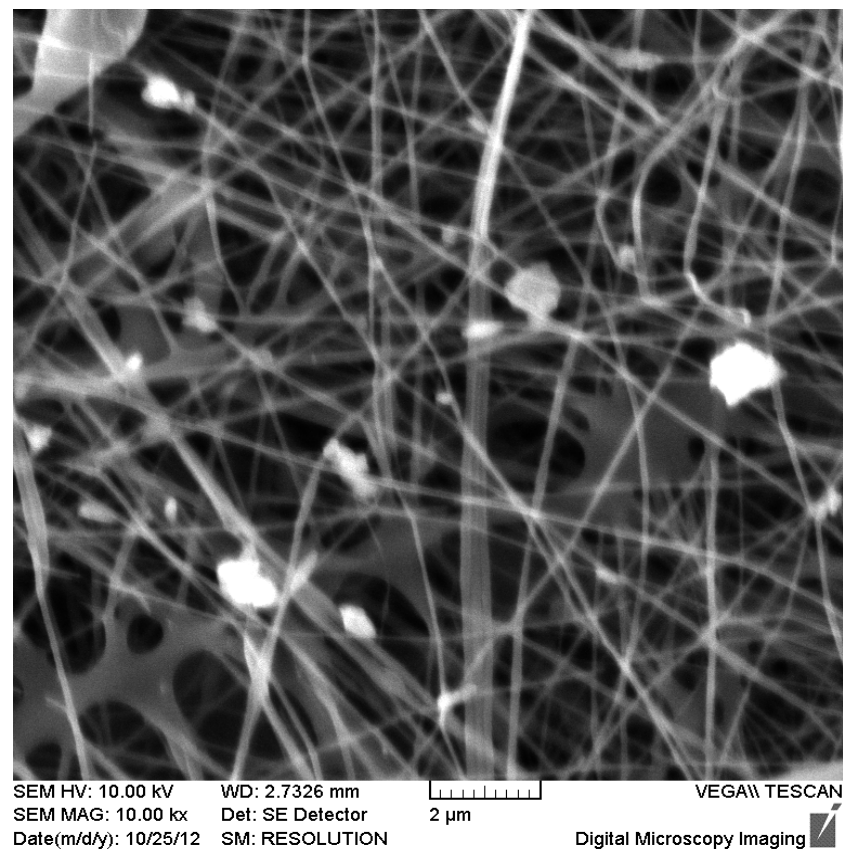


c

Obr. 12: Obrazová analýza vzorků 1HA o působení UV záření 0 minut (a), 10 minut (b) a 60 minut (c).



a



b

Obr. 13: Obrazová analýza vzorků 2HA o působení UV záření 0 minut (a) a 60 minut (b).

Tab. 6: Výsledky měření nasákavosti N vzorku Aquacelu v čištěné vodě.

Aquacel - čištěná voda						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	90,2000	0,2255	15,1602	6,0135	9,1467	40,6
2	91,0000	0,2275	15,0507	8,4684	6,5823	28,9
3	86,7200	0,2168	15,7515	8,8744	6,8771	31,7
4	91,3200	0,2283	15,0498	8,3937	6,6561	29,2
Průměr	89,8100	0,2245	15,2531	7,9375	7,3156	32,6
SD	2,1132	0,0053	0,3363	1,2999	1,2272	5,5

Tab. 7: Výsledky měření nasákavosti N vzorku Aquacelu v 0,9% roztoku chloridu sodného.

Aquacel - 0,9% roztok chloridu sodného						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	96,2800	0,2407	15,0397	10,6385	4,4012	18,3
2	95,8800	0,2397	15,1675	10,5177	4,6498	19,4
3	94,0800	0,2352	15,0386	10,6155	4,4231	18,8
4	94,2400	0,2356	15,1379	10,4395	4,6984	19,9
Průměr	95,1200	0,2378	15,0959	10,5528	4,5431	19,1
SD	1,1224	0,0028	0,0667	0,0919	0,1528	0,7

Tab. 8: Výsledky měření nasákavosti N vzorku 1HA10V1-9 v čištěné vodě.

1HA10V1-9						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	99,7711	0,1959	14,9157	12,7747	2,1410	10,9
2	109,7023	0,2154	14,8910	9,3408	5,5502	25,8
3	99,7201	0,1958	15,0302	11,8729	3,1573	16,1
4	104,3547	0,2049	14,9312	10,6110	4,3202	21,1
5	99,7201	0,1958	14,9801	10,3907	4,5894	23,4
6	108,1745	0,2124	15,0563	9,9608	5,0955	24,0
7	104,8640	0,2059	14,9756	9,6793	5,2963	25,7
8	106,0354	0,2082	15,0441	11,3257	3,7184	17,9
9	105,1696	0,2065	15,2217	11,9627	3,2590	15,8
Průměr	104,1680	0,2045	15,0051	10,8798	4,1253	20,1
SD	3,7180	0,0073	0,0998	1,1680	1,1394	5,2

Tab. 9: Výsledky měření nasákavosti N vzorku 1HA60V1-4 v čištěné vodě.

1HA60V1-4						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	101,2480	0,1988	15,4445	6,2968	9,1477	46,0
2	105,7808	0,2077	15,4104	8,0273	7,3831	35,5
3	102,2666	0,2008	15,2566	7,2375	8,0191	39,9
4	104,1001	0,2044	15,1307	8,6293	6,5014	31,8
Průměr	103,3489	0,2029	15,3106	7,5477	7,7628	38,3
SD	2,0053	0,0039	0,1451	1,0101	1,1134	6,1

Tab. 10: Výsledky měření nasákavosti N vzorku 1HA10F1-13 v 0,9% roztoku chloridu sodného.

1HA10F1-13						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	101,4008	0,1991	15,6009	13,5325	2,0684	10,4
2	100,2804	0,1969	15,1444	12,9372	2,2072	11,2
3	106,5956	0,2093	15,3693	13,2643	2,1050	10,1
4	112,2488	0,2204	14,9499	12,5399	2,4100	10,9
5	104,2529	0,2047	15,1034	12,5898	2,5136	12,3
6	107,3087	0,2107	15,0334	13,1926	1,8408	8,7
7	109,4477	0,2149	15,3245	13,0020	2,3225	10,8
8	107,5633	0,2112	15,2950	13,4219	1,8731	8,9
9	111,6377	0,2192	15,2795	13,6535	1,6260	7,4
10	101,0952	0,1985	15,3523	13,9638	1,3885	7,0
11	108,2763	0,2126	15,0130	12,6826	2,3304	11,0
12	102,3176	0,2009	15,0752	12,5236	2,5516	12,7
13	105,3733	0,2069	14,8865	12,5135	2,3730	11,5
Průměr	105,9845	0,2081	15,1867	13,0629	2,1239	10,2
SD	3,9511	0,0078	0,2026	0,4849	0,3539	1,7

Tab. 11: Výsledky srovnávací zkoušky měření nasákavosti N 0,5 g vzorku 1HA10V1-5 v čištěné vodě.

1HA10V1-5						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	257,3472	0,5053	30,2236	21,5097	8,7139	17,2
2	256,0231	0,5027	30,2000	17,2063	12,9937	25,8
3	253,2729	0,4973	30,1507	21,4526	8,6981	17,5
4	261,6762	0,5138	30,0277	20,1194	9,9083	19,3
5	252,6617	0,4961	30,2986	18,9231	11,3755	22,9
Průměr	256,1962	0,5030	30,1801	19,8422	10,3379	20,6
SD	3,6202	0,0071	0,1005	1,8196	1,8467	3,7

Tab. 12: Výsledky měření nasákavosti N vzorku 2HA60V1-7 v čištěné vodě.

2HA60V1-7						
	m (g/m²)	m₀ (g)	m_{K0} (g)	m_{K1} (g)	m₁ (g)	N (g/g)
1	101,4008	0,1991	15,0802	9,4113	5,6689	28,5
2	100,0766	0,1965	14,9988	9,1662	5,8326	29,7
3	100,8915	0,1981	15,2634	8,3348	6,9286	35,0
4	108,6838	0,2134	15,1470	8,8786	6,2684	29,4
5	102,9287	0,2021	15,1062	7,1185	7,9877	39,5
6	102,2666	0,2008	14,9137	7,7819	7,1318	35,5
7	104,2529	0,2047	15,2608	9,5748	5,6860	27,8
Průměr	102,9287	0,2021	15,1100	8,6094	6,5006	32,2
SD	2,8848	0,0057	0,1287	0,9074	0,8802	4,5

Tab. 13: Výsledky měření nasákavosti N vzorku 2HA60F1-8 v 0,9% roztoku chloridu sodného.

2HA60F1-8						
	m [g/m²]	m₀ [g]	m_{K0} [g]	m_{K1} [g]	m₁ [g]	N [g/g]
1	101,8083	0,1999	15,1126	11,8882	3,2244	16,1
2	106,6466	0,2094	15,1125	11,4044	3,7081	17,7
3	107,9198	0,2119	14,9444	11,3413	3,6031	17,0
4	105,8317	0,2078	15,1986	11,0950	4,1036	19,7
5	108,8875	0,2138	15,2088	11,1832	4,0256	18,8
6	104,2019	0,2046	14,9852	11,6118	3,3734	16,5
7	104,4566	0,2051	15,1421	11,9924	3,1497	15,4
8	102,3176	0,2009	15,0089	11,4413	3,5676	17,8
Průměr	105,2587	0,2067	15,0891	11,4947	3,5944	17,4
SD	2,5304	0,0050	0,0988	0,3179	0,3469	1,4

Tab. 14: Srovnání nasákavosti studovaných materiálů.

Vzorek	Prostředí	m ₀ (g)	UV (min)	Nasákavost N (g/g)
1HA	H ₂ O	0,5	10	20,6
	H ₂ O	0,2	10	20,1
	H ₂ O	0,2	60	38,3
	0,9% NaCl	0,2	10	10,2
2HA	H ₂ O	0,2	60	32,3
	0,9% NaCl	0,2	60	17,4
Aquacel	H ₂ O	0,2	–	32,6
	0,9% NaCl	0,2	–	19,1

Tab. 15: Výsledky dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pro hodnocení významnosti rozdílů mezi polymery a použitým nasákacím médiem

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Médium	1167.15	1	1167.15	66.67	≤ 0.01	4.75
Polymer	18.26	1	18.26	1.04	0.33	4.75
Interakce	51.75	1	51.75	2.96	0.11	4.75
Reziduum	210.08	12	17.51			
Celkem	1447.24	15				

9 Diskuse

9.1 Parametry ovlivňující zvlákňování

Tvorbu nanovláken ovlivňuje řada parametrů. Abychom vyrobili nanovláknenný materiál požadovaných vlastností, musíme zajistit správné podmínky výroby. Parametry ovlivňující vznik nanovláken se rozdělují na roztokové parametry (koncentrace roztoku, molekulová hmotnost polymeru, viskozita, povrchové napětí a vodivost roztoku), procesní parametry (velikost použitého elektrické napětí, rychlost průtoku roztoku zvlákňovací tryskou, typ zvlákňovací trysky a sběrného kolektoru, jejich vzájemná vzdálenost) a okolní parametry (teplota vzduchu, relativní vzdušná vlhkost, proudění vzduchu).^{16, 25}

9.1.1 Vliv povrchového napětí

Tvorba nanovláken je ovlivněna povrchovým napětím roztoku. Na povrchové napětí roztoku má hlavní vliv složení rozpouštědla, koncentrace roztoku má vliv minimální. Snížením povrchového napětí dochází k nižšímu výskytu koráلكových defektů.^{47,48} V našem případě jsme použili jako povrchově aktivní látku polyethylenoxid v již osvědčené koncentraci 1,2%.²⁷ Dosáhli jsme tak vyhovujících hodnot povrchového napětí a tvorby vláken s co nejnižším výskytem koráلكových defektů.

Výsledky měření povrchového napětí při teplotě 20 – 25 °C jsou uvedeny v Tab. 2. Průměrné hodnoty povrchového napětí roztoku byly pro 1HA1-3 61,30 mN·m⁻¹ a 62,27 mN·m⁻¹ u roztoku 2HA1-3.

9.1.2 Vliv vodivosti

Vodivost je důležitá charakteristika zvlákňovaného roztoku mající vliv na průběh zvlákňování. Bylo zjištěno, že zvýšením vodivosti může dojít k tvorbě menších koráلكových defektů a vzniklá nanovláknena mají menší průměr. Zatímco roztok o nízké vodivosti nedosáhne dostatečného prodloužení vlákna z trysky.^{25, 49} Vodivost lze zvýšit přidáním soli nebo kyseliny do roztoku.²⁵ Vodivost u zvlákňovaného roztoku HA nebyla potřeba upravovat.

Výsledky měření vodivosti jsou uvedeny v Tab. 2. U vzorku 1HA1-3 byla naměřena vodivost $4,55 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, u vzorku 2HA1-3 $4,08 - 4,12 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, kterou jsem pokládala za vyhovující.

9.1.3 Vliv koncentrace a viskozity

Roztoky s viskozitou o hodnotách $0,1 - 2,0 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ jsou vhodné ke zvlákňování. Při nižších hodnotách viskozity by mohlo dojít k rozbití proudu roztoku na kapičky, při vyšších hodnotách je roztok příliš viskózní, nelze ho zvláknit. Koncentrace polymeru v roztoku a viskozita roztoku spolu úzce souvisí; se zvyšující se koncentrací roztoku roste jeho viskozita. S vyšší koncentrací a tudíž i vyšší viskozitou dochází k tvorbě plochých vláken a vláken s větším a jednotnějším průměrem.⁵⁰

Viskozitu zvlákňovaného roztoku 1HA1-3 a 2HA1-3 jsem měřila na rotačním reometru v rozmezí rychlostního spádu $0,1-5000 \text{ s}^{-1}$. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3 a 4. Na Obr. 8 – 11 je znázorněn reogram, příp. viskozitní křivka. Z výsledků měření a obr. 8 a obr. 10 je patrné, že roztok 1HA1-3 a 2HA1-3 je možné charakterizovat jako nenewtonskou kapalinu s pseudoplastickým tokem.

9.1.4 Ostatní parametry

Na tvorbu a strukturu vláken a výskyt korálkových defektů má kromě již zmíněných vlastností roztoku nepochybně vliv také elektrické napětí použité při zvlákňování. Obecně lze říci, že s rostoucím elektrickým napětím roste i množství korálkových defektů.¹⁶ Se zvyšujícím se elektrickým napětím se snižuje průměr vzniklých vláken.²⁵

Je proto důležité správně vystihnout, jak vysoké elektrické napětí použijeme. Při zvlákňování vzorku 1HA jsem použila napětí 82 kV , u vzorku 2HA napětí 60 kV . Při zvýšení napětí u vzorku 2HA docházelo ke kvantitativnější tvorbě vláken, avšak výsledná vrstva na sběrné elektrodě byla vlhká, tudíž nevyhovující. Lze říci, že volba velikosti elektrického napětí je vysoce individuální. V tomto případě je výhodnější použít co možná nejnižší elektrické napětí, při kterém se bude daný roztok zvlákňovat.

Mezi další parametry ovlivňující proces zvlákňování pomocí electrospinningu v zařízení 4SPIN® patří teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu a rychlost proudění vzduchu v komoře zařízení, typ zvlákňovací a sběrné trysky a jejich vzájemná vzdálenost.¹⁶

Při zvlákňování jsem teplotu vzduchu udržovala v rozmezí $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Relativní vzdušná vlhkost se pohybovala v rozmezí $15,5 \pm 0,5 \%$. Při této vzdušné vlhkosti byla u vzorku 2HA vzniklá vláknenná vrstva na sběrné elektrodě příliš vlhká a nešla sejmut. Proto jsme byli nuceni vlhkost snížit až na 13,5%. Zvlákňovala jsem při rychlosti proudění vzduchu v komoře $53\text{m}^3/\text{hod}$. Jako zvlákňovací elektrodu jsem použila lineární bezjehlovou multitrysku, jako sběrnou elektrodu nerezovou desku, jejich vzdálenost byla nastavena na 20 cm.

9.2 Hodnocení nasákavosti

Nasákavost derivátů hyaluronanu jsem měřila metodou volného bobtnání podle patentu č. WO 93/12275 A1 firmy ConvaTec.¹ Zjišťovala jsem vliv hmotnosti vzorku a vliv doby působení UV záření na nasákavost připravených materiálů v čištěné vodě a v 0,9% roztoku chloridu sodného. Nasákavost derivátu hyaluronanu jsem srovnávala s komerčně dostupným výrobkem Aquacelem, jehož hydrokoloidní vlákna jsou tvořena z Na-karboxymethylcelulosity, která vytvářejí prostorovou síť.⁵¹ Průměrné výsledky nasákavosti vzorků 1HA, 2HA a Aquacelu při různých podmínkách jsou shrnuty v Tab. 8 – 14.

9.2.1 Vliv hmotnosti vzorku

Nejprve jsem potřebovala zjistit adekvátní hmotnost vzorku, se kterou bych mohla dále pracovat. Patentová metoda volného bobtnání¹ uvádí požadovanou hmotnost 0,5g vláken. Nanovláknenné materiály jsou velice lehké, a pokud bych uskutečnila zkoušku nasákavosti se vzorky této hmotnosti, měla bych nadměrnou spotřebu materiálu. Proto jsem nejprve provedla srovnávací zkoušku nasákavosti se vzorky o hmotnosti 0,5g ve 30 ml čištěné vody a 0,2g v 15 ml čištěné vody. Výsledky jsou interpretovány v Tab. 8 - 14. Výsledky zkoušky nasákavosti se vzorky o hmotnosti 0,5g a 0,2g byly srovnatelné. Z naměřených hodnot je patrné, že hmotnost

zkoušeného vzorku nebyla pro výsledek podstatná a zkoušku mohou dále provádět se vzorky o hmotnosti 0,2g.

9.2.2 Vliv doby působení UV záření

Nanovlákná připravena z derivátu kyseliny hyaluronové jsou rozpustná ve vodě.³⁰ Zesítním nanovláken jsme schopni tuto jejich vlastnost potlačit a zajistit tak jejich nerozpustnost ve vodě. Síťováním se přetváří lineární molekuly modifikovaného HA v trojrozměrné hydrogely. Zesítnění pomocí UV záření je efektivní, bezpečné a lehce regulovatelné. Na nasákavost nanovláknenných materiálů má vliv struktura materiálu, tedy i míra jeho zesítnění. Bylo zjištěno, že s prodlužováním doby ozařování materiálu UV zářením schopnost nasákavosti nanovláknenného materiálu rostla do určité optimální hranice, po níž opět klesala.⁵²

Na vzorek 1HA jsem nechala působit UV záření 10 a/nebo 60 minut. Poté jsem provedla zkoušku nasákavosti metodou volného bobtnání za stejných experimentálních podmínek (teplota a relativní vzdušná vlhkost okolního prostředí) se vzorky o hmotnosti 0,2 g. Vzorky jsem sledovala v čištěné vodě nebo 0,9% roztoku chloridu sodného. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 8- 14.

Z naměřených hodnot pro vzorek 1HA je zřejmé, že vzorky, na které působilo UV záření 60 minut, mají vyšší nasákavost v důsledku vyššího zesítnění.⁵² Z těchto výsledků jsem vycházela při následujícím měření nasákavosti vzorků 2HA, na které jsem nechala UV záření působit už pouze 60 minut.

Vzorky byly podrobeny obrazové analýze programem NIS elements. Záznamy jsou uvedeny na Obr. 12 a 13.

9.2.3 Vliv nasákačeho media

Porovnáním nasákavosti testovaných derivátů 1HA a 2HA v čištěné vodě nebo v 0,9% roztoku chloridu sodného, který simuluje přirozené prostředí organismu, jsem zjistila, že nasákavost v 0,9% roztoku chloridu sodného byla nižší, přibližně až o 60%. Promítá se zde vliv iontové síly roztoku.⁴¹

Výsledky jsou shrnuty v Tab. 8 – 14.

9.2.4 Srovnávací zkouška s Aquacelem

Pro hodnocení vlastností nově syntetizovaného derivátu hyaluronanu jsem provedla porovnávací zkoušku nasákavosti s komerčně dostupným výrobkem Aquacelem. Zkoušku jsem prováděla za stejných, již zmíněných podmínek, při teplotě $23,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, relativní vzdušné vlhkosti $33 \pm 2 \%$, hmotnost vzorku Aquacelu 0,2 g, v čištěné vodě a/nebo v 0,9% roztoku chloridu sodného.

Výsledky pokusu jsou rekapitulovány v Tab.6, 7 a 14. Z naměřených hodnot je zřejmé, že nasákavost derivátů hyaluronanu a již zavedeného výrobku Aquacelu, který má odlišnou chemickou strukturu, se výrazně neliší. Manipulace se vzorky derivátu hyaluronanu však nebyla snadná, docházelo ke smršťování materiálu. Aquacel si v porovnání s HA udržoval podstatně lépe tvar a lépe se s ním pracovalo. Lze říci, že nanovláknenný materiál připravený z derivátu hyaluronanu má dobrý potenciál pro zadržování kapaliny a je perspektivní pro další vývoj.

10 Závěry

Výsledky této experimentální diplomové práce umožnily formulovat následující závěry:

1. Roztokové parametry vzorku derivátu hyaluronanu byly vyhovující, odpovídaly podmínkám, za kterých lze vzorek zvláknit. U vzorku 1HA1-3 byla naměřena vodivost $4,55 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, u vzorku 2HA1-3 $4,08 - 4,12 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Průměrné hodnoty povrchového napětí roztoku byly pro 1HA1-3 $61,30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a $62,27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ u roztoku 2HA1-3.
2. Hmotnost vzorku použitého pro test nasákavosti nemá vliv na nasákavost. Při použití 0,2 g vzorku byly dosaženy srovnatelné výsledky jako při použití 0,5 g vzorku.
3. Doba ozáření vzorků UV zářením má vliv na nasákavost. Vzorek, na který působilo UV záření šedesát minut, má vyšší nasákavost v důsledku vyššího zesítení oproti vzorku, který byl vystaven UV záření deset minut.
4. Nasákavost vzorků pro čištěnou vodu (průměrná nasákavost $38,3 \text{ g/g}$) byla významně ($P \leq 0,01$) vyšší než pro 0,9% roztok chloridu sodného. (průměrná nasákavost $17,4 \text{ g/g}$).
5. Mezi nasákavostí vzorků HA60 a Aquacelu nebyly zjištěné významné rozdíly ($P \leq 0,01$). Nasákavost Aquacelu pro čištěnou vodu byla $32,6 \text{ g/g}$, pro 0,9% roztok chloridu sodného $19,1 \text{ g/g}$. U HA60 byly naměřeny hodnoty nasákavosti $32,3 \text{ g/g}$ a $17,4 \text{ g/g}$.

11 Použitá literatura

- ¹ HALE, Stephen, Geoffrey; J.Y. & G.W.Johnson: Patent No: WO 93/12275 A1. 24 June 1993
- ² POSPÍŠILOVÁ, A.: *Hojení chronických ran (Standard léčebného plánu)*, k 12.3.2013, <http://www.cslr.cz/download/hojeni-ran-standard.pdf>
- ³ *Hojení ran*, k 11.3.2013, <http://www.hojeni-ran.cz>
- ⁴ *Zánět, regenerace, hojení ran*, k 12.3.2013, http://www.med.muni.cz/patfyz/vl1011/VL10_1_3.pdf
- ⁵ *Hartmann*, k 13.3.2013, <http://www.lecbarany.cz/o-lecbe-ran/faze-hojeni-ran>
- ⁶ GAVLASOVÁ, L.: *Výběr terapeutického krytí na ránu*, k 18.3.2013, <http://www.osu.cz/dokumenty/monitoringmedii/885.pdf>
- ⁷ *Výběr krytí na ránu*, k 18.3.2013, <http://www.dtpce.cz/pdfs/kryti10.pdf>
- ⁸ *Traumacel*, k 19.3.2013, <http://www.traumacel.cz/katalog/traumacel-biodress>
- ⁹ *Nafigate*, k 18.2.2013, <http://www.nafigate.com/cs/section/portal/app/portal-article/detail/69818-o-nanovlaknech>
- ¹⁰ *Wikipedia*, k 18.2.2013, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nanovlákn>
- ¹¹ *Moodle TUL*, k 18.2.2013, https://moodle.fp.tul.cz/nano/pluginfile.php/689/course/section/262/Predn%C3%A1s%20ka%20%201_TNA_E.Kostakova%20KNT%20CFT%20TUL.pdf
- ¹² RAMAKRISHNA, S., TEO W. E.: A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 2006, 17 (14), s. R89 - R106.
- ¹³ *Fiberiotech*, k 23.4.2013, <http://fiberiotech.com/technology/forcespinning/>
- ¹⁴ RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W. E., LIM, T. CH., MA, Z.: *An introduction to electrospinning and nanofibers*. 2005, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 5 Toh Tuck Link, Snigapore, 341 s., ISBN 981-256-415-2.
- ¹⁵ BEACHLEY, V., WEN, X.: Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35 (7), s. 868-892.

-
- ¹⁶ RŮŽIČKOVÁ J.: Uvolňování začleněných látek ze struktury nanovláken a možnosti využití v medicíně, Disertační práce. 2010. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní, Liberec, 118s.
- ¹⁷ *Wikipedia*, k 23.2.2013, <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning>
- ¹⁸ LI, D., XIA, Y.: Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?. *Advanced Materials*, 2004, 16 (14), s. 1151-1170.
- ¹⁹ Podklady k výuce na TUL, k 24.2.2013,
<https://moodle.fp.tul.cz/nano/course/view.php?id=22>
- ²⁰ *Electropinning*, k 6.3.2013,
<http://www.che.vt.edu/Faculty/Wilkes/GLW/electrospinning/electrospinning.html>
- ²¹ *Elmarco*, k 23.2.2013, <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>
- ²² *4spin*, k 11.4.2013, <http://www.4spin.info/>
- ²³ UM, I.C., FNAG, D., HSIAO, B.S., OKAMOTO, A., CHU, B.: Electro- spinning and electro- blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules*, 2004, 5 (4), s. 1428-1436.
- ²⁴ ZHANG, Y., LIM, CH. L., RAMAKRISHNA, S., HUANG, Z. – M.: Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, 16 (10), s. 933-946.
- ²⁵ BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C.: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 2010 , 28 (3), s. 325-347.
- ²⁶ ZHANG, L., WEBSTER, T. J.: Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 2009, 4 (1), s. 66-80.
- ²⁷ HUANG, Z.-M., ZHANG, Y.-Z., KOTATI, M., RAMAKRISHNA, S.: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2003, 63 (15), s. 2223-2253.
- ²⁸ LI, F., ZHAO, Y., SONG, Y.: Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. <http://www.intechopen.com>, k 25.2.2012

-
- ²⁹ LONG, L., YANFENG, L., JIANGHUA, L., GUOCHENG, D., JIAN, CH.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10 (1), s. 99 – 107.
- ³⁰ ROMAGNOLI, M., BELMONTESI, M.: Hyaluronic acid–based fillers: theory and practice. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26 (2), s. 123-159.
- ³¹ KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, (2007), 29 (1), s. 17 – 25.
- ³² CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L. K.: Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66 (4), s. 341–351.
- ³³ *MicrobeWiki*, k 17.1.2013,
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_zooepidemicus
- ³⁴ PIRES, A., M., B., SANTANA, M., H., A.: Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 162 (6), s. 1751-1761.
- ³⁵ YOKOI, N., KOMURO, A., NISHIDA, K., KINOSHITA, S.: Effectiveness of hyaluronan on corneal epithelial barrier function in dry eye. *British Journal of Ophthalmology*, 1997, 81 (7), s. 533-536.
- ³⁶ CALONGE, M.: The Treatment of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology*, 2001, 45 (2), s. S227-S239.
- ³⁷ ANDRE, P.: Hyaluronic Acid and Its Use as a “Rejuvenation” Agent in Cosmetic Dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 2004, 23 (4), s. 218-222.
- ³⁸ KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2006, 29 (1), s. 17-25.
- ³⁹ GARG, H. G., HALES, CH. A.: *Chemistry and biology of hyaluronan*, 2004, Elsevier Ltd, Oxford, 605 s., ISBN 0-08-044382-6. SHU, X. Z.,

PRESTWICH, G. D.: *Therapeutic Biomaterials from Chemically Modified Hyaluronan*, s. 475 – 504.

⁴⁰ VELEBNÝ, V.: Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství, Teze habilitační práce. 2012. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno, 29s.

⁴¹ POURJAVADI, A., GHASEMZADEH, H., SOLEYMAN, R.: Synthesis, characterization, and swelling behavior of alginate- g- poly(sodium acrylate)/kaolin superabsorbent hydrogel composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 105 (5), s. 2631-2639.

⁴² LIU, M., GUO, T.: Preparation and swelling properties of crosslinked sodium polyacrylate. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 82 (6), s. 1515-1520.

⁴³ MALLEPALLY, R. R., BERNARD, I., MARIN, M. A., WARD, K. R., MCHUGH, M. A.: Superabsorbent alginate aerogels. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.11.024>.

⁴⁴ *Wikipedia*, k 23.4.2013, http://en.wikipedia.org/wiki/Superabsorbent_polymer

⁴⁵ MA, S., LIU, M., CHEN, Z.: Preparation and properties of a salt-resistant superabsorbent polymer. *Polymer Engineering and Science*, 2004, 93 (6), s. 2532-2541.

⁴⁶ HANSEN, L. M., SMITH, D. J., RENEKER, D. H., KATAPHINAN, W.: Water absorption and mechanical properties of electrospun structured hydrogely. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 95 (2), s. 427-434.

⁴⁷ DOSHI, J., RENEKER, D. H.: Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 1995, 35 (2-3), s. 151-160.

⁴⁸ FONG, H., CHUN, I., RENEKER D. H.: Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 40 (26), s. 4585–4592.

⁴⁹ ZONG, X., RAN, S., FANG, D., HSIAO, B. S., CHU, B.: Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide- co - lactide) non- woven membranes via post- draw treatments. *Polymer*, 2003, 44 (17), s. 4959-4967.

⁵⁰ DEITZEL, J. M., KLEINMEYER, J., HARRIS, D., BECK TAN, N. C.: The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 2001, 42 (1), s. 261-272.

⁵¹ *Traumacel*, k 15.12.2012, <http://www.traumacel.cz/aktuality/porovnn-efektivit-lby-nehojcch-se-ran-krytm-aquacel-a-traumacel-biodress>

⁵² ZHOU, CH., WANG, Q., WU, Q.: UV-initiated crosslinking of electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87 (2), s. 1779-1786.